

Proefstation voor de Bloemisterij
 Linnaeuslaan 2a
 1431 JV Aalsmeer

Zetmeel en suikergehaltes in verband met knopopening bij roos 'Madelon'

Verslag proef 3001-3

C. Slootweg
 april 1988

Inleiding

Bij de roos 'Madelon' blijkt de knopopening vaak niet goed te verlopen. In literatuur wordt verband gelegd tussen vaasleven en koolhydraatgehaltes in de bloemkroon (o.a. Ho en Nichols 1977, Sacalis en Chee Kok Chin 1976 en Kaltaler en Steponkus 1976).

Aangezien bij rozen behalve het vaasleven ook de knopopening van belang is, en mogelijk ook hier koolhydraten een belangrijke rol spelen is methodiekontwikkeling voor deze bepaling gewenst.

Er zijn vele verschillende koolhydraten in de plant aanwezig die alle een verschillende rol spelen. Enkele daarvan zijn: osmoticum (alle suikers), transport suiker (saccharose) en opslag (zetmeel).

De belangrijkste koolhydraten zijn:

- Uit de groep reducerende suikers: glucose en fructose
- Uit de groep niet-reducerende suikers: saccharose
- Zetmeel

Voor bepaling van deze koolhydraten zijn vele methodes beschreven.

Enkele daarvan zijn:

- HPLC; voor alle suikers afzonderlijk.
- Anthron; voor totaal suikergehalte.
- Nelson-Somogyi, Shaffer-Somogyi; voor reducerende suikers.
- Enzymatische bepalingen (bijv. van de firma Boehringer); voor glucose, fructose, saccharose en zetmeel.
- Gaschromatograaf; voor alle suikers afzonderlijk.
- Auto-analyser; voor gebruik met verschillende colorimetrische technieken, voor verschillende suikers.

Zetmeel wordt (behalve enzymatisch) meestal bepaald door dit te hydrolyseren en dan de suikers te bepalen met één van de bovenstaande methodes.

Methodes

Extractie

De meeste bepalingen zijn gedaan aan het volgende materiaal.

Roos 'Madelon' geoogst 14/12 in stadium 2. Van 19 knoppen zijn alle petalen in vloeibare stikstof (-196°C) in een mortier tot poeder gemalen. Dit poeder is bewaard in de diepvries (-20°C).

Van dit poeder zijn twee extracten gemaakt op de volgende wijze. 2 gram knopmateriaal in 20 ml 80% ethanol; 30 minuten roeren op magnetische roermotor bij kamertemperatuur. Dit extract 15 minuten centrifugeren bij 5000 rpm. Supernatant

tant afschenken in droogdampkolfje. Het pellet suspenderen in 10 ml 80% ethanol en weer 30 minuten roeren. Dit wordt nog éénmaal herhaald. Totaal wordt dus driemaal geëxtraheerd. Supernatant droogdampen met behulp van rotavapor bij 40°C. Opnemen in 25 ml demiwater en in porties van 4 ml invriezen bij -20°C. Dit is extract A, waarin zich de suikers bevinden. Het pellet wordt 'gedroogd' met perslucht totdat de alcohol eruit verdampt is. Dit poeder wordt opgenomen in 5 ml demiwater. Vervolgens wordt 2,5 ml 8 N HCL toegevoegd en één uur bij 100°C in een waterbad verwarmd om het zetmeel te hydrolyseren. Met behulp van 8 N NaOH-oplossing wordt de pH op 5-7 gesteld en dan 15 minuten bij 5000 rpm gecentrifugeerd. Indien geen mooi pellet ontstaat filtreren en filter naspoelen met demiwater tot een volume van 25 ml. Anders supernatant aanvullen tot 25 ml. In porties van \pm 4 ml invriezen bij -20°C. Dit is extract B, waarin zich de suikers afkomstig van het zetmeel bevinden. De extractie voor de Boehringer enzym-kit voor zetmeelbepaling wordt bij de beschrijving van de methode beschreven.

Suikerbepalingen

De enzymatische methode

Gebruikt wordt de Boehringer enzym-kit voor D-glucose en D-fructose, cat. no. 139106. De kit bevat drie oplossingen, te weten: opl. 1. NADP en ATP in buffer, opl. 2. hexokinase en glucose-6-fosfaat dehydrogenase, opl. 3. fosfoglucoisomerase.

In een plastic weggooicuvet wordt als volgt gepipetteerd (in duplo):

	blanco	monster
opl. 1.	1,00 ml	1,00 ml
monster	-	0,10 ml
water	2,00 ml	1,90 ml

Cuvet afsluiten met Parafilm, schudden en na drie minuten absorbtie bepalen bij 340 nm (A1). Dan reactie starten door toevoegen van:

opl. 2.	0,02 ml	0,02 ml
---------	---------	---------

Schudden en na tien minuten, als reactie is gestopt, A2 bepalen. Dan toevoegen:

opl. 3.	0,02 ml	0,02 ml
---------	---------	---------

Schudden, na tien minuten A3 bepalen.

A1 is de blanco waarde, A2 een maat voor de hoeveelheid glucose en A3 een maat voor de hoeveelheid glucose plus fructose. De absorbtieverschillen zijn aan de hand van de gebruiksaanwijzing eenvoudig om te rekenen naar gram glucose en fructose per liter extract.

Anthron-methode

Deze methode voor de bepaling van totaal suikergehalte berust op een kleurreactie van suiker met anthron in een zuur milieu na verhitting. Voor deze bepaling moet al het gebruikte glaswerk van te voren met verdund zwavelzuur gespoeld worden. Zeepresten storen in de bepaling.

Stockoplossing H_2SO_4 : 200 g ijs (van demiwater) in een bekeerglas in smeltend ijs zetten. Voorzichtig (in zuurkast) 500 ml geconcentreerd zwavelzuur erop gieten.

Voor gebruiksklare anthronoplossing 200 mg anthron per 100 ml H_2SO_4 -stock. Dit is kort houdbaar; als de kleur niet meer helder geel is: wegdoen.

Werkwijze

5 ml anthronoplossing in een pyrex buis pipetteren. 'Hierop' monster, eventuele glucose standaard-oplossing en water pipetteren tot een totaalvolume (incl. anthron) van 6 ml. Vijf minuten laten staan, goed mixen op de Vortex (stroperige zwavelzuur mengt moeilijk), buis afsluiten met glazen knikker en tien minuten in een kokend waterbad zetten. Hierna direct overzetten in smeltend ijs, vijf minuten laten staan en direct absorbtie meten bij 625 nm. Gebruik van de autocell in de spectrofotometer is hierbij gewenst, omdat zich boven in de buis door teruglopend condens wat witte troebeling kan vormen en het monster dan onderuit gezogen kan worden. Er moet dan wel een zuurbestendige pompslag gemonteerd worden (acid tubing kit). De bepalingen worden uitgevoerd in duplo.

De Nelson-Somogyi methode

Dit is een colorimetrische bepaling van de reducerende suikers.

Bereiding van de oplossingen

Mixreagens.

A: 25 g Na_2CO_3
25 g $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4 H_2O$ (kaliumnatriumtartraat)
20 g $NaHCO_3$
200 g Na_2SO_4
oplossen in 1 liter Demiwater

B: 30 g $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$
4 druppels geconcentreerd H_2SO_4
oplossen in 200 ml Demiwater
Gebruiksklare oplossing: 25 ml A + 1 ml B

Molybdaatreagens:

1: 25 g $(NH_4)_6 Mo O_{24} \cdot 4 H_2O$
oplossen in 450 ml Demiwater
21 ml geconcentreerd H_2SO_4 toevoegen

2: 3 g $Na_2AsO_4 \cdot 7 H_2O$
oplossen in 25 ml Demiwater

Na menging van deze twee oplossingen wordt dit mengsel 24 uur bij $37^\circ C$ gezet of 25 minuten bij $55^\circ C$. Deze twee reagentia zijn goed houdbaar. Er kan echter uitkristallisering optreden. Dit is door verwarming weer op te lossen.

Werkwijze

Voor deze bepaling moeten goed schone pyrexbuizen gebruikt worden. Eén nacht in 1 N H_2SO_4 is voldoende.

In de buizen wordt 0,1 ml extract en/of 0,1 ml van een ijkoplossing van glucose gepipetteerd en dit wordt met water aangevuld tot 0,5 ml. Daarbij komt 0,5 ml mix-reagens. Dit wordt goed gemengd met behulp van de Vortex en, afgesloten met een glazen knikker, 20 minuten in een waterbad van 100°C gezet. Hierna wordt nogmaals gemengd op de Vortex en na afkoeling wordt 0,5 ml molybdaatreagens toegevoegd. Weer wordt gemengd, dan 2,5 ml demiwater toevoegen en nogmaals mengen.

De absorbtie wordt gemeten bij 520 nm. De bepaling wordt uitgevoerd in duplo.

Zetmeelbepalingen

De JKJ-kleuringsmethode

Deze methode berust op de zwartkleuring van zetmeel met behulp van JKJ.

JKJ-oplossing: 1,5 g KI + 1,5 g I in 50 ml demiwater. Enkele uren laten roeren op magnetische roermotor en affiltreren.

Extract: 3 g petalenpoeder in 30 ml demiwater. Twee uur in kokend waterbad en daarna affiltreren.

Werkwijze

In een buis wordt 3 ml demiwater, 1 ml extract en 0,2 ml JKJ-oplossing gepipetteerd. Dit wordt goed gemengd en doorgemeten bij 600 nm.

De enzymatische methode

Deze methode berust op de enzymatische hydrolyse van zetmeel tot glucose, wat dan op dezelfde wijze als bij de enzymatische suikerbepaling gemeten wordt. Gebruikt wordt de Boehringer enzymkit cat. no. 207748. De kit bevat drie oplossingen, te weten opl. 1: amyloglucosidase in buffer, opl. 2: NADP en ATP in buffer, opl. 3: hexokinase en glucose-6-fosfaathydrogenase. In de bepaling wordt een behandeling opgenomen waarmee het glucosegehalte van het extract, zonder hydrolyse, wordt bepaald (monster blanco).

Extractie

1 g petalenpoeder wordt in een 100 ml erlenmeyer afgewogen. Hieraan wordt 5 ml 8 N HCL en 20 ml DMSO (dimethylsulfoxide) toegevoegd. Dit gaat 30 minuten in een waterbad van 60°C. Hierna wordt 50 ml demiwater toegevoegd en de pH met NaOH op 4-5 gesteld. Dit wordt aangevuld tot 100 ml en afgefiltreerd. De bepaling wordt in duplo uitgevoerd in plastic weggooi cuvetten.

Werkwijze

pipetteerschema:

	Reagentia blanco	monster	monster blanco
opl. 1.	0,20 ml	0,20 ml	-
monster	-	0,10 ml	0,10 ml
Demiwater	0,10 ml	-	-

Afsluiten met parafilm, voorzichtig schudden en 15 minuten in een waterbad van 55-60°C. Dan toevoegen:

opl. 2.	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
Demiwater	1,00 ml	1,00 ml	1,20 ml

Schudden, na drie minuten absorbtie bij 340 nm meten (A1) en de reactie starten door toevoegen van:

opl. 3.	0,20 ml	0,20 ml	0,20 ml
---------	---------	---------	---------

Schudden, na tien minuten, als de reactie compleet is, absorbtie A2 meten.

Aan de hand van de gebruiksaanwijzing is eenvoudig het zetmeelgehalte, in g/l, te berekenen.

Suikerbepalingen aan gehydrolyseerd extract

Aan het gehydrolyseerde extract (extract B) kan door suikerbepaling het oorspronkelijke zetmeelgehalte bepaald worden. Zetmeel bestaat namelijk uitsluitend uit D-glucose (Verleur, 1983).

Resultaten en discussie

Suikerbepalingen

Bij de suikerbepalingen is gekozen voor drie technieken: Anthron, Nelson-Somogyi en de Boehringer enzym-kit voor glucose en fructose. HPLC-bepalingen kunnen door de afwezigheid van apparatuur op het Proefstation Aalsmeer niet worden gedaan. Een gaschromatograaf is wel aanwezig, doch deze is ingericht voor ethyleenmetingen en zou voor suikerbepalingen omgebouwd moeten worden en dus onbruikbaar worden voor het doel waarvoor hij is aangeschaft. Een auto-analyser is sinds kort wel aanwezig, maar hiervoor moet een aparte, dure, unit aangeschaft worden, die waarschijnlijk weinig voordelen biedt boven één van de andere colorimetrische bepalingen.

Van de Boehringer enzym-kits is voor suikerbepaling alleen de glucose/fructose kit uitgeprobeerd. Er is ook een kit voor de bepaling van saccharose. Gezien de eenvoud en de betrouwbaarheid van de uitgeprobeerde kits (glucose/fructose en zetmeel) en de ervaringen van Gorin en Spekking (1980), is de kans groot dat de saccharose-kit ook voor genoemd extract bruikbaar is. Alle drie technieken gaven met glucose een rechte ijklijn te zien en het toevoegen van extract had geen invloed hierop (zie voor anthron en Nelson/Somogyi fig. 1). Het bereiden van het petalenpoeder met vloeibare stikstof blijkt een goede

techniek te zijn, het malen in een mortier geeft echter een minder mooi poeder dan van een elektrische molen. Deze laatste moet zeker aangeschaft worden. De bewaring van het poeder bij -20°C geeft geen 'zichtbare' problemen, de kans bestaat echter dat ook bij -20°C zetmeel afgebroken wordt. De bewaring van het poeder moet daarom zo kort mogelijk gehouden worden, òf plaatsvinden bij -80°C , hetgeen echter grote investeringen vergt.

De extractiemethode zoals beschreven voldoet goed. Extractie in water geeft minder totaalsuikers en meer reducerende suikers te zien. Dit is waarschijnlijk het gevolg van invertase werking. Directe suikerbepaling in een ethanol-extract geeft bij alle drie methodes gevoeligheidsverliezen, dat wil zeggen droogdampen en opnemen in water is noodzakelijk. Het extract is goed bij -20°C te bewaren. In het extract is geen opgelost zetmeel aan te tonen met de Boehringer enzym-kit.

Het extract is direct te gebruiken in de Boehringer enzym-kit voor glucose/-fructose. De absorbtie van het extract zelf is vrij hoog, maar dat heeft geen invloed op de aantoonbaarheid van suiker (tab. 1). De kosten van deze eenvoudig uitvoerbare bepaling zijn vrij hoog (+ f 120,- voor 25 bepalingen). Deze kosten zouden gedrukt kunnen worden door kleinere hoeveelheden van de reagentia en het extract te gebruiken in een kleinere cuvet. De betrouwbaarheid is bij 1/3 van de hoeveelheden nog goed (Tuinbouw-plantenteelt, mondeling).

De anthronbepaling zoals beschreven voldoet goed. De gevoeligheid voor glucose, fructose en saccharose is vrijwel gelijk (fig. 2). De toets is eenvoudig uit te voeren en goedkoop, echter het werken met zeer geconcentreerd zwavelzuur vergt veel oplettendheid.

De Nelson-Somogyi bepaling zoals beschreven voldoet ook goed. Deze bepaling is nogal gevoelig voor storingen, zoals niet geheel schoon glaswerk (fig. 3). De bepaling is eenvoudig uit te voeren en vrij goedkoop.

Zetmeelbepalingen

De Boehringer enzym-kit voor zetmeel in combinatie met de beschreven extractiemethode voldoet goed. De kosten zijn vergelijkbaar met die van de suikerbepaling, maar kunnen waarschijnlijk op dezelfde wijze als boven beschreven gedrukt worden.

De beschreven hydrolyse-methode geeft in de gestelde tijd een volledige hydrolyse van het zetmeel te zien (fig. 4). Het extract (B) bevat volgens de Boehringer kit ook, zij het weinig, fructose. Dit is moeilijk verklaarbaar, omdat zetmeel geheel uit glucose zou bestaan. De extractie met ethanol (3x) is voldoende om alle suikers te verwijderen en verwacht mag worden dat alle in de plant voorkomende enzymen in de ethanol onwerkzaam gemaakt zijn. Een mogelijke verklaring is, dat andere polysacchariden achterblijven en tijdens de hydrolyse afgebroken worden. Hassid and Neufeld (1964) en Pucher et al. (1947) beschrijven een methode waarmee het zetmeel eerst wordt gegelatineerd, met JKJ neergeslagen, dan afgecentrifugeerd en weer opgelost. Deze methode zou het bovengenoemde storende verschijnsel kunnen oplossen.

De Nelson-Somogyi- en anthron-bepalingen geven met het gehydrolyseerde extract geen problemen.

De zetmeelbepalingmethode met JKJ, die voor aardappels goed voldoet (VU, Amsterdam), is voor rozepetalen onbruikbaar; de gevoeligheid is afhankelijk van de zetmeelconcentratie in het extract. Pucher et al (1947) heeft deze problemen ook reeds beschreven.

Vergelijking van methodes

Een vergelijking van de methodes aan hetzelfde extract is een riskante bezigheid, omdat de methodes op heel verschillende principes berusten. Storingen die materiaal-eigen zijn, en daarom bij een vergelijking van behandelingen binnen hetzelfde materiaal niet relevant zijn, komen nu wel naar voren. Dit wil dus niet zeggen dat de ene methode beter is dan de andere. De vergelijking wordt nog vertroebeld doordat elke getoetste methode andere componenten meet. Toch volgt hier een vergelijking van de methodes.

	Suiker g/100 g materiaal	Zetmeel g/100 g materiaal
glucose + fructose volgens Boehringer	1,03	0,61
Reducerende suikers volgens Nelson-Somogyi	1,75	2,63
Totaal suikers met Anthron	2,25	1,63
Zetmeel volgens Boehringer	-	0,62

De verschillen in de eerste kolom zijn verklaarbaar uit het feit dat er nog andere reducerende suikers aanwezig zijn, buiten glucose en fructose. En uiteraard uit de aanwezigheid van niet-reducerende suikers. De getallen in de tweede kolom (zetmeel) zouden in principe alle gelijk moeten zijn, omdat alle suikers van zetmeel afkomstig zouden zijn. De enorme verschillen zullen dus op andere wijze verklaard moeten worden. Somogyi (1952) schrijft dat bij gebruik van de Nelson-Somogyi methode voor bloedsuiker eerst de eiwitten verwijderd moeten worden. Of eiwitten in de bepaling bij rozen storend werken is niet bekend. Pluijmen (1987) heeft bij verschillende plantmaterialen drie suikerbepalingsmethodes vergeleken: Shaffer - Somogyi (vrijwel gelijk aan Nelson - Somogyi), HPLC en de Boehringer enzym-kit. Hij vindt bij Shaffer - Somogyi altijd hogere waarden dan bij HPLC, bij sommige plantmaterialen tot 30% meer. Met HPLC vindt hij geen andere suikers dan glucose, fructose en saccharose, zodat hij het verschil wijt aan storende componenten in het weefsel. De waarden door hem verkregen met de enzym-kit waren altijd lager dan met HPLC, mogelijk veroorzaakt door remming van het enzym òf oxidatie van NADPH. Dit laatste was in de hier beschreven experimenten niet het geval, getuige de recovery van toegevoegd glucose van 100% voor de suiker-kit. Aan het petalenpoeder toegevoegd zetmeel bij de enzym-methode gaf een recovery te zien van 84%. Dit komt overeen met de bevindingen van Heidema (1982) bij tulpespruiten. Dit feit en de overeenkomst van de uitkomsten van de zetmeel-kit en de enzymatische suikerbepaling aan gehydrolyseerd extract pleiten sterk voor gebruik van deze methode. Indien de Nelson-Somogyi- of anthron-bepaling uitgevoerd wordt zal rekening gehouden moeten worden met storende effecten in het extract, zodat de te meten verschillen groot genoeg moeten zijn òf een zuivering moet worden toegepast.

Vergelijking van de genoemde methodes met HPLC voor het te onderzoeken gewas kan ook duidelijkheid verschaffen omtrent de te hechten waarde aan verschillen tussen behandelingen.

Samenvatting

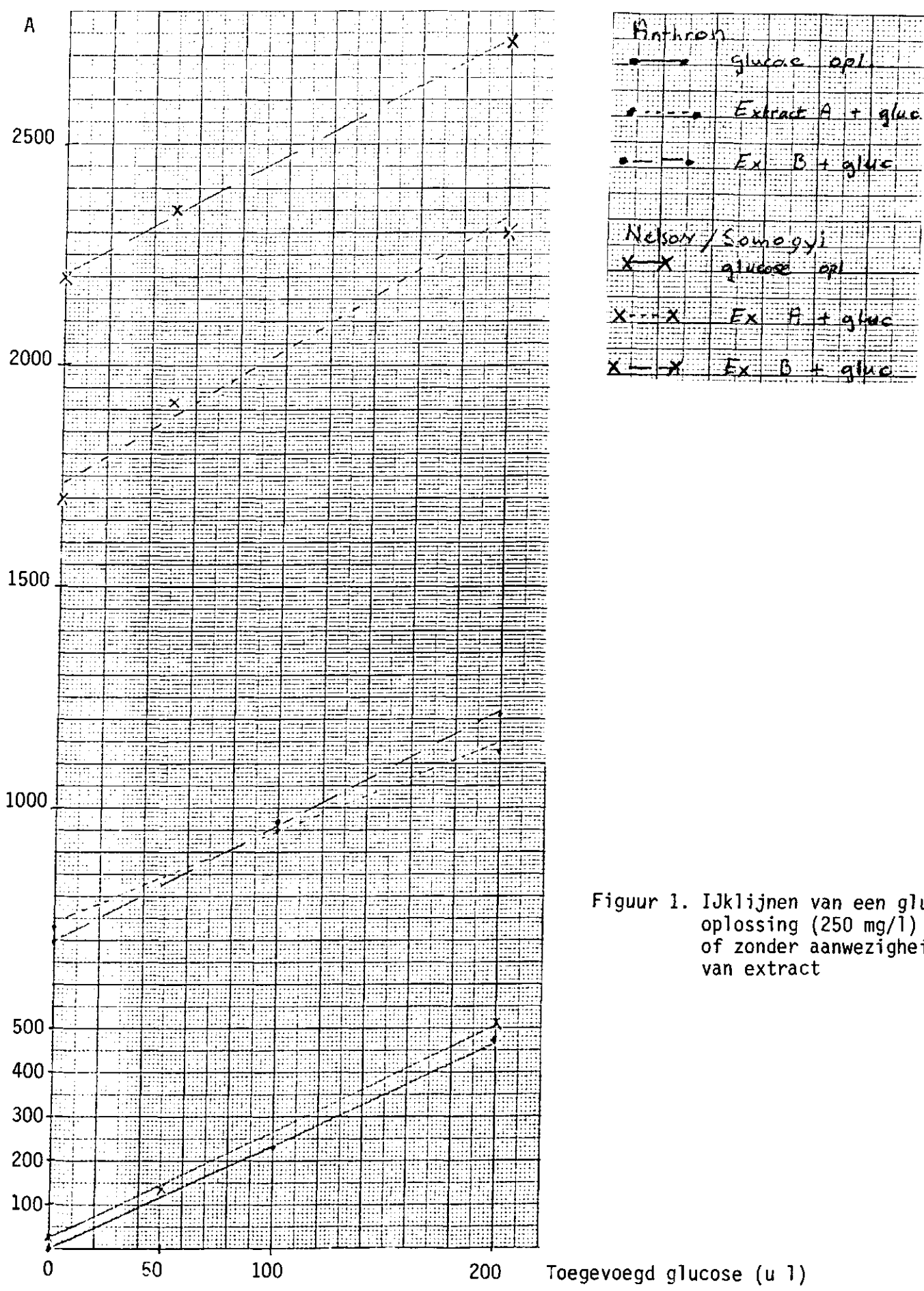
Onderzocht zijn drie verschillende methodes voor suikerbepaling, te weten: Boehringer enzym-kit voor glucose en fructose, Anthron-bepaling voor totaal suikergehalte en de Nelson-Somogyi-methode voor de bepaling van reducerende suikers. Alle methodes zijn bruikbaar voor extract van roze petalen. De keuze zal afhangen van de te bepalen suikers en de gewenste specificiteit. Zetmeelbepaling is direct mogelijk met een Boehringer enzym-kit. Het is ook mogelijk om na hydrolyse van het zetmeel tot suiker een suikerbepaling met één van bovengenoemde methodieken te doen.

Literatuur

- Gorin N., Spekking W.Th.J.; 1980; Enzymatische analyse van glucose, fructose en sucrose in poeder van roze blaadjes. Het effect van het oplosmiddel in de resultaten. Rapport no. 2105, Sprenger Instituut.
- Hassid W.Z., Neufeld E.F.; 1964; Quantitative determination of starch in plant tissues. Methods in carbohydrate chemistry, volume IV. Academic Press, London.
- Heidema T.; 1982; Zetmeelgehalte en amylase-activiteit in meeldraden van de kiem van tulpebollen tijdens de koudebehandeling (12 weken bij 5°C) en bij 17°C (controle). Intern verslag no. 599, Sprenger Instituut.
- Ho L.C., Nichols R.; 1977; Translocation of sucrose-C-14 in relation to changes in carbohydrate content in rose corollas cut at different stages of development. Ann. Bot. 41: 227-242.
- Kaltaler R.E.L., Steponkus P.L.; 1976; Factors affecting respiration in cut roses. J. Am. Soc. Hort. Sci. 101: 353-354.
- Mac Rae J.C.; 1970; Quantitative measurement of starch in very small amounts of leaf tissue. Planta 96: 101-108.
- Pluijmen M.H.M.; 1987; Sugar analysis with the Shaffer-Somogyi micro-analysis, High Performance Liquid Chromatography and enzymatic analysis in crop samples. Comm. in soil science and plant analysis 18 (9): 1049-1059.
- Pucher W. et al.; 1947; Determination of starch in plant tissues. Anal. Chem. 20 (9): 850-853.
- Sacalis J.N., Chee Kok Chin; 1976; Metabolism of sucrose in cut roses I. Comparison of sucrose pulse and continuous sucrose uptake. J. Am. Soc. Hort. Sci. 101: 254-257.
- Somogyi M.; 1952; Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-23.
- Verleur J.D.; 1983; Fotosynthetische assimilatie van koolzuur. Plantenfysiologie: 92-120, Bohn, Scheltema en Holkema.
- Tuinbouwplantenteelt: recepten.
VU, Amsterdam: recepten.
- Yemm E.W., Willis A.J.; 1954; The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochem. J. 57: 508-514.

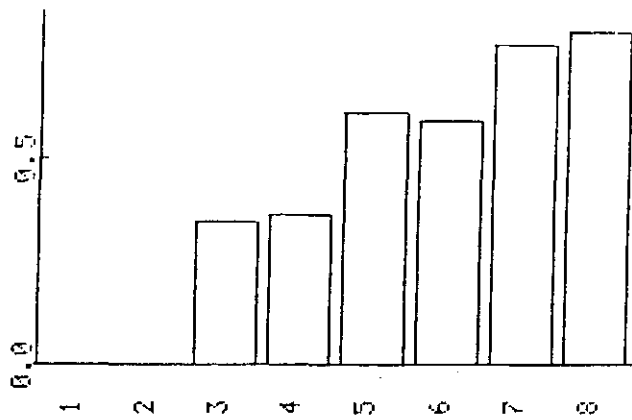
Tabel 1. Absorbtiewaarden van de Boehringer enzym-kit van blanco, glucose, extract en extract plus glucose.

	A1	A2	A3
blanco	0,11	0,11	0,12
glucose 0,5 g/l	0,11	0,72	0,72
extract A	1,45	1,89	2,41
extr. + gluc.	1,48	2,52	> 3



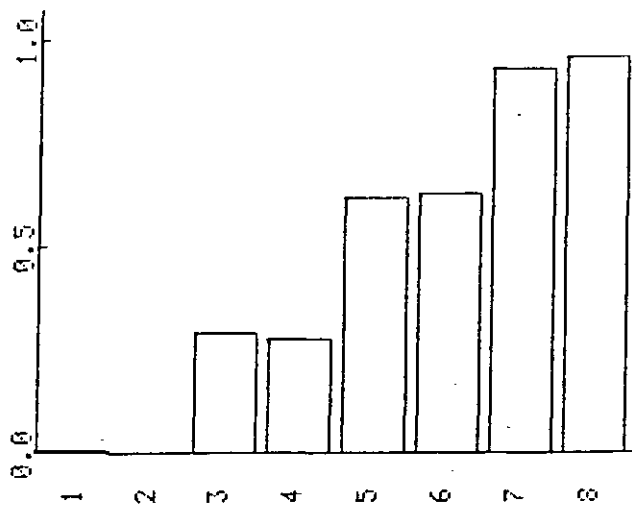
Figuur 1. IJklijnen van een glucose-oplossing (250 mg/l) met of zonder aanwezigheid van extract

Figuur 2. Anthronbepaling aan verschillende suikers



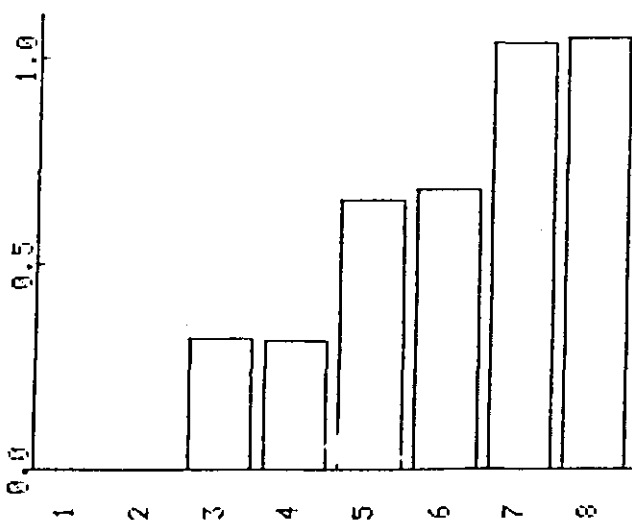
Sample No.	Cycle No.	ABS
1	1	-0.002
2	1	-0.012
3	1	0.346
4	1	0.363
5	1	0.610
6	1	0.589
7	1	0.774
8	1	0.806

Glucose (0,25 g/l) 0, 0,2, 0,4 en 0,6 ml (duplo)



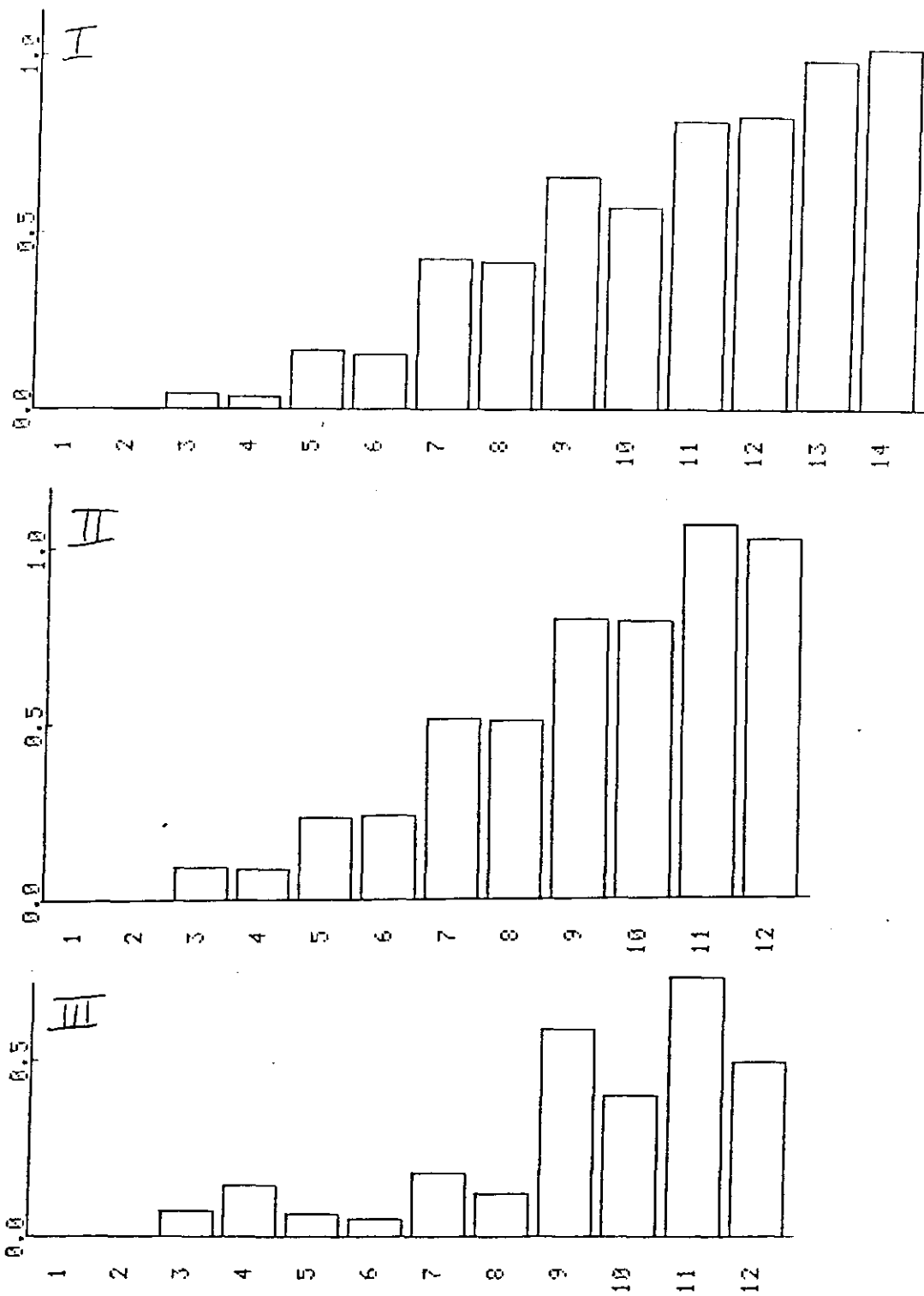
Sample No.	Cycle No.	ABS
9	1	0.008
10	1	-0.030
11	1	0.292
12	1	0.275
13	1	0.618
14	1	0.628
15	1	0.932
16	1	0.960

Saccharose (0,25 g/l) 0, 0,2, 0,4 en 0,6 ml (duplo)

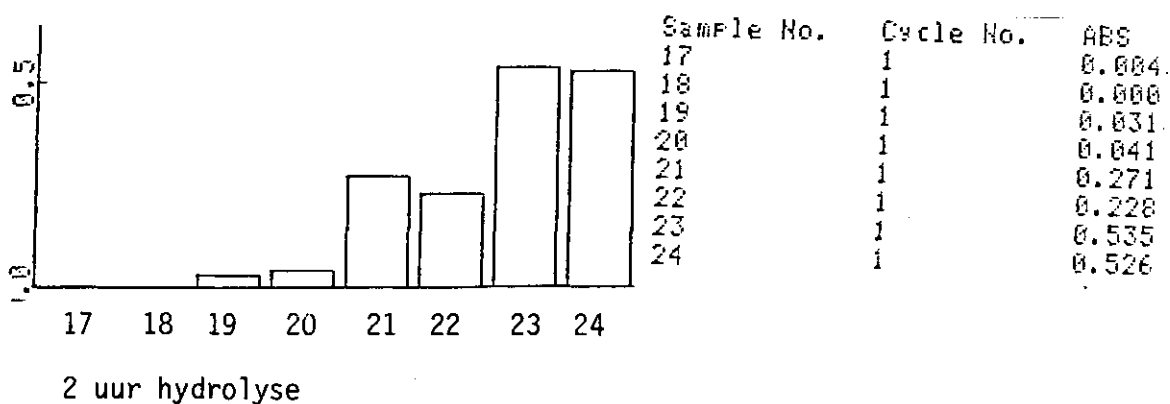
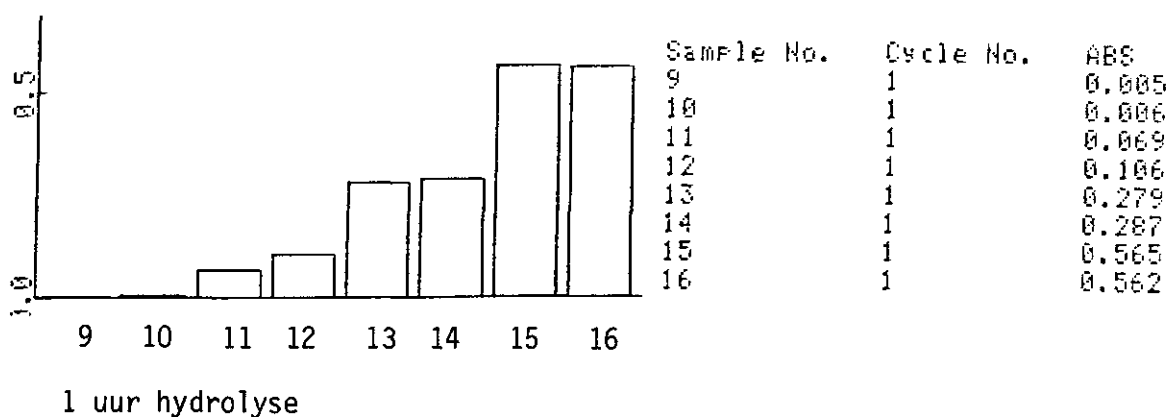
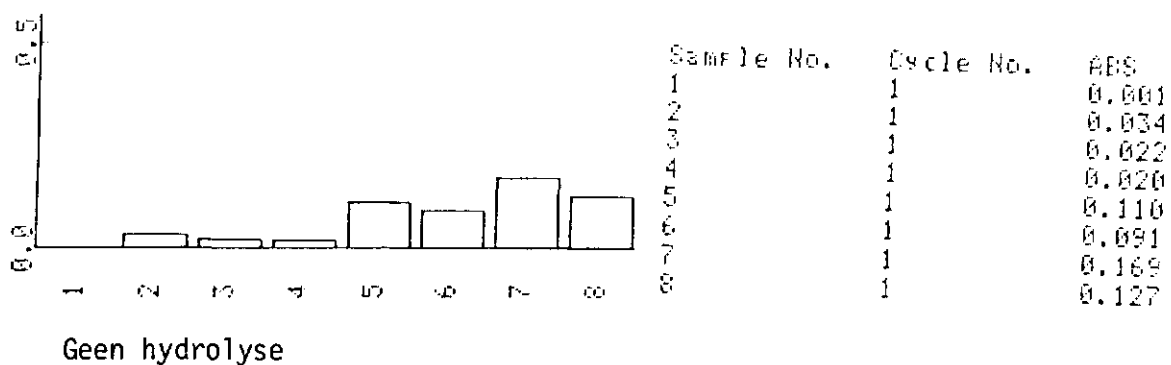


Sample No.	Cycle No.	ABS
17	1	-0.008
18	1	-0.040
19	1	0.321
20	1	0.314
21	1	0.657
22	1	0.681
23	1	1.039
24	1	1.049

Fructose (0,25 g/l) 0, 0,2, 0,4 en 0,6 ml (duplo)



Figuur 3. Invloed van gebruikte buizen op de uitkomst van de Nelson-Somogyi bepaling
 I = nieuwe plastic buizen
 II = pyrex buizen, één nacht in 1 N H₂SO₄
 III = met leidingwater en demiwater gewassen buizen
 0, 25, 50, 100, 150, 200 en 250 ul glucose-oplossing van 0,5 g/l in duplo



Figuur 4. Hydrolysetijden van het pellet van een ethanolextract van roze petalen
 Bepaling met Anthronmethode
 0, 10, 50 en 100 µl in de toets in duplo