

RASCHER NACHWEIS VON SACCHAROSE IN MOST UND IN WEIN*

Von

L. TELEGDY KOVÁTS und R. KOLTA

Institut für Nahrungsmittelchemie der Technischen Universität, Budapest,

(Eingegangen am 27. November, 1958)

Das immer häufiger vorkommende Zuckern des Mostes erfordert die Einführung einer Methode, die diese gegen bestehende und gültige Verordnungen verstoßende Manipulation schon bei der Übernahme, also an Ort und Stelle einfach und rasch festzustellen gestattet.

Der größte Teil der Methoden für den Nachweis des eventuellen Saccharosegehaltes von Most und Wein beruht darauf, daß man die reduzierenden Zucker in alkalischen Media zerstört, worauf die unverändert gebliebene Saccharose mit einem spezifischen Reagens nachgewiesen wird. Auf Grund der Arbeiten von ROTHENFUSSE [9, 10, 11, 12] fand für Most und Wein die Diphenylaminmethode die größte Verbreitung. Wird der Wein oder Most mit Bariumhydroxyd und Wasserstoffperoxyd erwärmt, können alle reduzierenden Zucker zerstört werden; die Saccharose bleibt unverändert und gibt in saurem Medium mit Diphenylamin selbst in großer Verdünnung eine blaue Verfärbung. Eigentlich reagiert auf gleiche Weise auch die Fruktose, weshalb die vorherige Zerstörung der reduzierenden Zucker nötig ist. SCHLEMMER [13] zerstört mit Kalkmilch unter Erwärmen und weist die Saccharose sodann mit α -Naphtol nach.

Neuerdings wurde eine Saccharose-Nachweismethode für Most und Wein von GAROGLIO und STELLA [3], [4] mitgeteilt. Das zu prüfende Material wird mit Magnesiumoxyd und Bleiazetat erwärmt, danach mit Kaliumpermanganat oxydiert, die filtrierte Probe mit Diphenylamin geprüft auf Saccharose und die entstandene farbige Verbindung mit Chloroform ausgeschüttelt. Aus dem Farbton wird auch darauf gefolgert, ob das Zuckern mit Saccharose oder Invertzucker geschah. Laut WEGER [14] entspricht jedoch die Methode zum Nachweis des Zuckers nicht vollkommen.

Die Ausführung all dieser Methoden wird durch den Umstand erschwert, daß es zu ihrer Anwendung einer Laboratoriums-Ausrüstung und längerer Zeit bedarf, weshalb sie sich also zur Kontrolle an Ort und Stelle nicht eignen. Wir versuchten deshalb, die Saccharose-Probe von RAYBIN [6] auf Wein

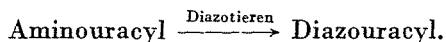
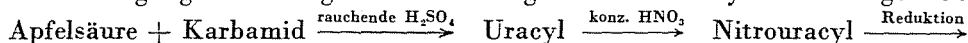
* Mit Ft 20 000 prämierte Arbeit.

und Most anzuwenden. Gemäß dieser erhalten wir mit 7—10 mg Diazouracyl, in 5 ml n/20 Natriumhydroxyd-Lösung bei 10° C schon mit 40—50 mg Saccharose binnen einiger Minuten eine bläulichgrüne Farbreaktion. Die entstandene farbige Verbindung erzeugt mit Magnesiumionen einen stabilen Niederschlag. In dieser Weise reagieren außer Saccharose nur Oligosaccharide, in denen Saccharose eingebaut ist. (Raffinose, Gentianose, Stachyose) [7]. Die sonstigen verschiedenen Oligosaccharide, Monosaccharide, Zuckerzerfallprodukte geben höchstens eine gelbliche Färbung.

Im folgenden werden zuerst die Herstellung des Raybin-Reagens, sodann die Ergebnisse der mit dem Reagens durchgeführten Kontrollen bzw. die Ergebnisse der Experimente bekanntgegeben.

Herstellung des Reagens

Der gangbarste Weg zur Herstellung von Diazouracyl ist der folgende :



Zur Herstellung von Uracyl laut DAVIDSON und BAUDISCH [2] werden 100 g Karbamid unter Kühlung in 400 ml rauchender Schwefelsäure (15% SO₃) gelöst. Die Temperatur soll unter 10° C bleiben. Danach werden 100 g Apfelsäure zugesetzt, worauf die Mischung eine Stunde lang auf einem Wasserbad gewärmt wird. Bei ungefähr 60° C kann eine starke Entwicklung von CO beobachtet werden und es entsteht Uracyl. Wollen wir Nitrouacyl herstellen, ist die Isolierung von Uracyl aus diesem Reaktionsgemisch nicht erforderlich.

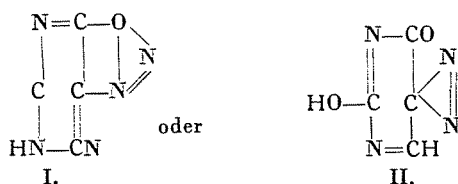
Die Herstellung von 5-Nitrouacyl nach Bogert und Davidson [1]. In das heiße Reaktionsgemisch werden unter starkem Rühren aus einem Scheidetrichter 100 ml rauchende Salpetersäure (spez. Gew. 1,5) langsam zugetropft, die eine starke Erwärmung verursachen. Die innere Temperatur wird auf 105—110° C gehalten, indem man den Kolben in Wasser taucht und so kühlt. Nach Zugabe der ganzen erforderlichen Salpetersäure-Menge wird das Gemisch noch eine Stunde lang über dem Wasserbad gewärmt, danach abgekühlt und auf 1500 g zerhacktes Eis gegossen. Das 5-Nitrouacyl scheidet aus und kann filtriert werden. Es wird mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Ausbeute 55—60 g (47—51%).

Dieses Produkt ist ohne weitere Reinigung zur Herstellung von 5-Aminouracyl geeignet.

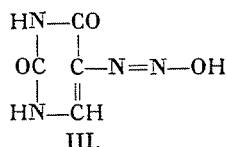
Die Herstellung von 5-Aminouracyl nach Bogert und Davidson [1]: 15,7 g 5-Nitrouacyl werden im Gemisch von 10 ml konz. Ammoniak und 250 ml Wasser suspendiert und unter Rühren 75 g technisches Natriumdithionit

($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) zugegeben. Die Lösung erwärmt sich und die Temperatur steigt in 10—15 Minuten auf 55°C . Das Gemisch wird danach bis zum Sieden erhitzt, sodann abgekühlt und das 5-Aminouracyl (10 g) abfiltriert. Das rohe Produkt wird im Gemisch von 10 ml konz. Salzsäure und 100 ml Wasser gelöst, die Lösung mit ein wenig aktiver Kohle geklärt und filtriert. Das Filtrat wird auf 300 ml verdünnt, bis zum Sieden erwärmt, mit 10 ml konz. Ammoniak behandelt und abgekühlt. Das reine 5-Aminouracyl scheidet in Form farbloser, seidigglänzender Nadeln aus. Ausbeute 9,2 g (73%).

Die Herstellung von 5-Diazouracyl. Nach JOHNSON, BAUDISCH und HOFFMANN [5] erhält man aus 5-Aminouracyl in n Salzsäure bei -5°C durch Diazotieren mit 0,97 mol% Natriumnitrit das weiße Anhydrid, dessen wahrscheinliche Struktur



ist. Es ist ferner noch das rotfarbige Hydrat folgender Form bekannt :



III und I ist von der Wasserstoffionen-Konzentration abhängig. Wird die rote Lösung von III mit 2 n Salzsäure behandelt und rasch abgekühlt, scheidet I in schönen, gelblichen Kristallen aus.

Wir unsererseits wandten folgenden Arbeitsgang an: 10 g 5-Aminouracyl werden im Gemisch von 35 ml Wasser und 25 ml konz. Salzsäure gelöst, die Lösung wird bis unter -5°C gekühlt. 5,7 g Natriumnitrit, in 30 ml Wasser gelöst, werden unter -5°C gekühlt und unter Rühren in die Salzsäure-Lösung getropft. Die Temperatur darf $+5^\circ\text{C}$ nicht überschreiten. Das sich erwärmende Gemisch wird dann unter starkem Rühren neuerlich bis unter -5°C abgekühlt. Binnen einiger Minuten beginnt die Diazouracyl-Ausscheidung. Nach 10 Minuten wird filtriert, zweimal mit Eiswasser, zweimal mit Alkohol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute 6,5—7,0 g (60—65%)

Diazouracyl geht mit aromatischen Aminen und Phenolen in alkalischem Medium nur langsam Verbindungen ein. Im ultravioletten Licht wird es rasch gelb, dann braun, wobei Stickstoff entweicht. Trocken, vor Licht geschützt, kann es Monate lang aufbewahrt werden, ohne zu zerfallen.

Experimenteller Teil

Untersuchungen an Modellösungen

Im Laufe unserer Arbeit hatten wir uns davon zu überzeugen, wie die Raybin-Probe von der Laugenkonzentration, der Temperatur und von der neben der Saccharose gleichzeitig vorhandenen Glukose, Fruktose und Schwefelsäure beeinflusst wird.

Die Wirkung von Laugenkonzentration und Temperatur

Bei einer Schnellmethode ist es umständlich, die ursprünglich empfohlene $n/20$ Laugenkonzentration und die Temperatur von 10° C pünktlich einzuhalten, weshalb wir die Farbenreaktion einerseits auf zunehmende Laugenkonzentrationen andererseits auf ansteigende Temperaturen untersuchten. Die bei verschiedenen Laugenkonzentrationen erhaltenen Ergebnisse sind aus Tafel 1, die mit der Änderung der Temperatur erzielten Resultate dagegen aus Tafel 2 ersichtlich.

Tafel I

Die Farbe der Raybin-Probe bei verschiedenen Laugenkonzentrationen
Saccharosenmenge 40 mg, Diazouracylmenge 10 mg, Lösungsvolumen 5 ml, Temperatur
 10° C, Zeitdauer 4 Minuten

| Natriumhydroxyd- konzentration | Farbton |
|-----------------------------------|--------------|
| 0,02 n | grünlichblau |
| 0,05 n | bläulichgrün |
| 0,10 n | „ |
| 0,20 n | grün |
| 0,50 n | „ |
| 1,00 n | „ |

Mann erkennt, daß sich der Farbton bei höheren Laugenkonzentrationen ein wenig ändert, eine andere die Bestimmung beeinflussende Folge kann jedoch nicht beobachtet werden.

Aus Tafel 2 läßt sich feststellen, daß die Probe auch bei einer höheren als der in der ursprünglichen Publikation empfohlenen Temperatur von 10° C durchgeführt werden kann, doch erscheint die Farbe bei einer höheren Temperatur schneller und ist weniger haltbar.

Tafel 2

Die Farbe der Raybin-Probe bei verschiedenen Temperaturen
 Saccharosenmenge 40 mg, Diazouracyl 10 mg, Lösungsvolumen 5 ml, Laugenkonzentration 0,25 n, Zeitdauer 2 und 4 Minuten

| Temperatur °C | Farbton nach | |
|---------------|-----------------|----------------|
| | 2 Minuten | 4 Minuten |
| 5 | o | hellgrün |
| 10 | hellgrün | grün |
| 15 | hellgrün | grün |
| 20 | hellgrün | grün |
| 25 | hellgrün | grün |
| 30 | grün | gelblich grün |
| 35 | gelblich grün | bräunlich gelb |

Die Wirkung von Glukose und Fruktose

Da beim nachgewiesenen Zuckern des Mostes neben der Saccharose gleichzeitig auch Glukose und Fruktose vorhanden sind, war es notwendig, zu untersuchen, wie diese die Farbreaktionen beeinflussen, weshalb zu einer konstanten Menge von Saccharose in zunehmender Menge Glukose bzw. Fruktose zugegeben und die sich bildende Farbe untersucht wurde (Tafel 3).

Tafel 3

Die Farbe der Raybin-Probe in Gegenwart von Glukose und Fruktose
 Diazouracylmenge 10 mg, Volumen 5 ml, Laugenkonzentration 0,25 n, Temperatur 20° C, Zeitdauer 4 Minuten

| Glukose mg | Fruktose mg | Saccharose mg | Farbton |
|------------|-------------|---------------|----------------------------|
| 100 | — | 40 | grün |
| 200 | — | 40 | grün |
| 300 | — | 40 | grün |
| 400 | — | 40 | grün |
| 400 | — | — | hellgelb |
| — | 100 | 40 | grün |
| — | 200 | 40 | grün |
| — | 300 | 40 | gelblichgrün |
| — | 400 | 40 | gelblichgrün (unsicher) |
| — | 400 | — | gelb |
| 200 | 200 | 40 | grün |

Der Nachweis der Saccharose wird also durch die Glukose nicht gestört, hingegen vermindert Fruktose die Empfindlichkeit ein wenig. Der Grund hierfür besteht wahrscheinlich darin, daß die durch die Fruktose entstehende gelbe Verbindung die grüne Farbe der Diazouracyl-Saccharose-Verbindung überdeckt.

Wirkung der schwefligen Säure

Wir untersuchten ferner, inwiefern die im Wein und Most eventuell vorhandene schweflige Säure den Nachweis der Saccharose beeinflusst. Gleichzeitig gaben wir auch 200 mg Glukose und 200 mg Fruktose zur Probe, um die Reaktion in einer Probe zu untersuchen, die mit dem Zuckergehalt des Mostes ungefähr identisch ist (Tafel 4).

Tafel 4

Farbe der Raybin-Probe bei verschiedenem SO_2 -Gehalt
Saccharose 40 mg, Glukose 200 mg, Fruktose 200 mg, Diazouracyl 10 mg, Volumen 5 ml,
Laugenkonzentration 0,25 n, Temperatur 20° C, Zeitdauer 4 Minuten

| Sulfit, als SO_2 mg | Farbe |
|------------------------------|---------------|
| — | grün |
| 0,5 | grün |
| 1,0 | grün |
| 1,5 | gelblich grün |
| 2,0 | gelblich grün |
| 2,5 | gelblich grün |

Es konnte somit festgestellt werden, daß bei einem SO_2 -Gehalt von über 1,5 mg (entspricht 600 mg/l SO_2 , falls 2,5 ml Wein und 2,5 ml Laugenlösung in Betracht genommen werden) die grüne Farbe etwas blasser ist. Eine so große Menge von SO_2 kommt jedoch in Most oder Wein selten vor, die störende Wirkung beeinflusst also den Nachweis der Saccharose in der Praxis nicht.

Untersuchungen an natürlichem Most und Wein

Die Gegenwart von Saccharose in Most und Wein wiesen wir folgendermaßen nach: Ungefähr 10 ml Most oder Wein schüttelten wir in einer Eprovette mit aktiver Kohle (ca. 0,5 g), filtrierten in eine andere Eprovette 2—3 ml durch ein Filtrierpapier, vermischten das vollkommen farblose Filtrat mit 0,5 n Natriumhydroxid gleichen Volumens und schüttelten die Lösung mit ca. 7—10 mg festem Diazouracyl. Nach einigen (2—5) Minuten untersuchten wir die entstandene Farbenreaktion.

Eine Zugabe von 1 ml 6%igem Magnesiumsulfat erleichtert die Auswertung, weil die farbige Verbindung im alkalischen Medium mit dem Magnesiumhydroxid zusammen ausscheidet.

Zu unseren Versuchen verwendeten wir weißen Most (16% Invertzucker, 500 mg/l gesamtes SO₂, 250 mg/l freies SO₂), farbigen Most (18% Invertzucker, 400 mg/l gesamtes SO₂, 230 mg/l freies SO₂), weißen Wein (12% Alkohol, 120 mg gesamtes SO₂, 20 mg/l freies SO₂, zuckerfrei) und roten Wein (12% Alkohol; Zucker und Schwefelsäure war nicht vorhanden).

Wir setzten den Versuchs-Mosten und -Weinen Saccharose in verschiedenen Mengen zu und prüften der beschriebenen Untersuchungsmethode gemäß die auftretende Farbreaktion. Die Untersuchungen wurden parallel auch unter Zugabe von Magnesiumsulfat durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Tafeln 5 und 6 zusammengefaßt.

Tafel 5

Nachweis von Saccharose im Most mit Diazouracyl

| Dem Most beigegebene Saccharose, % | Farbe | | | |
|------------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | Most I. (weiß) | | Most II. (farbig) | |
| | ohne MgSO ₄ | mit MgSO ₄ | ohne MgSO ₄ | mit MgSO ₄ |
| 0,0 | gelb | gelb | gelb | gelb |
| 0,5 | grünlich gelb | weiß | grünlich gelb | weiß |
| 1,0 | gelblich grün | hellgrün | gelblich grün | hellgrün |
| 2,0 | hellgrün | grün | hellgrün | grün |
| 3,0 | grün | grün | grün | grün |
| 4,0 | grün | grün | grün | grün |

Ein Gehalt von weniger als 1% Saccharose kann im Most nur unsicher nachgewiesen werden, über 1% ist aber der Nachweis nach der beschriebenen Methode ziemlich verläßlich. In Wein läßt sich die Saccharose noch sicherer nachweisen, jedoch geht bei Rotwein die ausgebildete grüne Farbe ein wenig in Gelb über. Wird die Behandlung mit aktiver Kohle nicht sorgfältig genug durchgeführt, erhält man beim Rotwein bräunliche Töne, was wahrscheinlich eine Folge des zurückbleibenden Tannins ist. Die entstandene Farbe wird nach 5 Minuten schwächer, und die Lösung wird langsam bräunlich gelb. Mit Magnesiumsulfat läßt sich die Farbe leichter auswerten — besonders bei kleinerer Saccharose-Konzentration — und sie bleibt auch längere Zeit konstant, so daß die Empfindlichkeit des Nachweises erhöht werden kann.

Unseren Untersuchungen gemäß eignet sich also die Raybinsche Saccharose-Diazouracyl Farbreaktion mit entsprechenden Abänderungen zum

Tafel 6
Nachweis von Saccharose im Wein

| Dem Wein beigegebene Saccharose, % | F a r b e | | | |
|---------------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | Wein I. (weiß) | | Wein II. (rot) | |
| | ohne MgSO ₄ | mit MgSO ₄ | ohne MgSO ₄ | mit MgSO ₄ |
| 0,0 | gelb | gelb | gelb | gelb |
| 0,5 | gelblich grün | hellgrün | gelblich grün | hellgrün |
| 1,0 | hellgrün | hellgrün | hellgrün | hellgrün |
| 2,0 | grün | grün | grün | grün |
| 3,0 | grün | grün | grün | grün |
| 4,0 | dunkelgrün | dunkelgrün | bräunlich grün | dunkelgrün |

raschen Nachweis der im Most oder Wein eventuell vorhandenen Saccharose. Der Vorzug der Methode besteht darin, daß sie sich mit einfachen Mitteln ohne Laborausüstung leicht und rasch durchführen läßt und keine besondere Fachbildung beansprucht. Deshalb scheint sie zum raschen Nachweis der Weinverfälschungen durch Zuckern an Ort und Stelle geeignet.

Zusammenfassung

Die entsprechend modifizierte Raybinsche Diazouracyl-Probe ist nach unseren Erfahrungen zum raschen Nachweis der Saccharose in Most und Wein gut geeignet. Der Vorzug der Methode besteht darin, daß sie mit einfachen Mitteln ohne Laboratorium und Laboratoriumsapparate schnell ausgeführt werden kann, und keine Fachkenntnisse benötigt. Auf Grund dieser Erfahrungen ist die Methode zur Ermittlung der Zuckering von Most und Wein am Ort und Stelle besonders vorteilhaft anwendbar.

Literatur

1. BOTERT, M. T.—DAVIDSON, D.: J. Am. Chem. Soc. **55** 1667 (1933).
2. DAVIDSON, D.—BAUDISCH, O.: J. Am. Chem. Soc. **48** 2379 (1926).
3. GAROGLIO, P. G.—STELLA, C.: Riv. viticolt. e enol. **8** 155 (1955).
4. GAROGLIO, P. G.—STELLA, C.: Riv. viticolt. e enol. **8** 385 (1955).
5. JOHNSON, T. B.—BAUDISCH, O.—HOFFMANN, A.: Berichte **64** 2629 (1931).
6. RAYBIN, H. W.: J. Am. Chem. Soc. **55** 2603 (1933).
7. RAYBIN, H. W.: J. Am. Chem. Soc. **59** 1402 (1937).
8. ROTHENFUSSER, S.: Z. U. L. **18** 135 (1909).
9. ROTHENFUSSER, S.: Z. U. L. **19** 261 (1910).
10. ROTHENFUSSER, S.: Z. U. L. **21** 554 (1911).
11. ROTHENFUSSER, S.: Z. U. L. **24** 93 (1912).
12. ROTHENFUSSER, S.: Z. U. L. **24** 558 (1912).
13. SCHLEMMER, J.: Listy Cukrovarnické **45** 243.: Ref. Ch. Zbl. **II** 881 (1927).
14. WEGER, B.: Mitt. Klosterneuburg **6** 25 (1956).

Prof. L. TELEGDY KOVÁTS, }
R. KOLTA, } Budapest, XI. Múgyetem rakpart 3. Ungarn.