

zur Bestimmung der Glucose- und Ethanol-Konzentration
Boehringer Mannheim / R-Biopharm

	Ethanol-Bestimmung	Glucose-Bestimmung
Zielsetzung	Messung des Ethanol-Gehalts einer Lösung (in g/l).	Messung des Glucose-Gehalts einer Lösung (in g/l).
Ausgangssituation	Ethanol kann direkt im Fotometer nicht bestimmt werden.	Glucose kann direkt im Fotometer nicht bestimmt werden.
Lösungsansatz	Enzymatische Umsetzung von Ethanol unter Bildung einer Substanz, die im Fotometer gemessen werden kann.	Enzymatische Umsetzung von Glucose unter Bildung einer Substanz, die im Fotometer gemessen werden kann.
Testprinzip	Gekoppelter enzymatischer Test (= 2 nacheinander ablaufende Enzym-Reaktionen)	
Beteiligte Enzyme	Alkohol-Dehydrogenase Aldehyd-Dehydrogenase	Hexokinase Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
Edukte	Ethanol + NAD ⁺	Glucose + ATP
Zwischenprodukte	Acetaldehyd + NADH + H ⁺	Glucose-6-Phosphat + ADP
Endprodukte	Essigsäure + NADH + H ⁺	6-Phosphogluconat + NADPH + H ⁺
Reaktionsbilanz	Bildung von 2 Molekülen NADH pro vorhandenem Molekül Ethanol	Bildung von 1 Molekül NADPH pro vorhandenem Molekül Glucose
Nachweis möglich aufgrund	Unterschiedliche Absorptionsspektren von NAD ⁺ und NADH NADH verfügt bei ca. 340 nm über ein Absorptionsmaximum, NAD ⁺ nicht → je mehr NADH gebildet wird, desto größer ist die Absorption.	Unterschiedliche Absorptionsspektren von NADP ⁺ und NADPH NADPH verfügt bei ca. 340 nm über ein Absorptionsmaximum, NADP ⁺ nicht → je mehr NADPH gebildet wird, desto größer ist die Absorption.
Messung der Absorption E bei	Wellenlänge 340 nm Nullabgleich erfolgt gegen Luft ohne Küvette	
Ermittlung von Differenz ΔE	Differenz ΔE = (E ₂ - E ₁) _{Probe} - (E ₂ - E ₁) _{Leerwert}	
Berechnungsgrundlage	Lambert-Beer'sches Gesetz Differenz ΔE = Extinktionskoeffizient ε * Konzentration c * Schichtdicke d mit ε _{NADH} bzw. ε _{NADPH} = 6,3 [l * mmol ⁻¹ * cm ⁻¹] Daraus ergibt sich c = ΔE * ε ⁻¹ * d ⁻¹ [mmol / l]	
Konzentrationsberechnung [g/l]	$c = \frac{V * MG * \Delta E * F}{\epsilon * d * v * 2 * 1000}$	$c = \frac{V * MG * \Delta E * F}{\epsilon * d * v * 1000}$
	<ul style="list-style-type: none"> • V = Testvolumen (1,575 ml) • MG = Molgew. Ethanol (46,07 g/mol) • v = Probevolumen (0,05 ml) • d = Schichtdicke (1 cm) • F = Verdünnungsfaktor (optional) 	<ul style="list-style-type: none"> • V = Testvolumen (1,51 ml) • MG = Molgew. Glucose (180,16 g/mol) • v = Probevolumen (0,05 ml) • d = Schichtdicke (1 cm) • F = Verdünnungsfaktor (optional)
	$c = 0,115 * \Delta E * F \text{ [g}_{\text{Ethanol}} \text{ / l]}$	$c = 0,864 * \Delta E * F \text{ [g}_{\text{Glucose}} \text{ / l]}$