

D-Sorbit/Xylit

Farb-Test

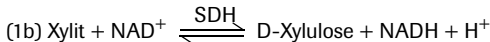
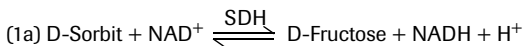
zur Bestimmung von D-Sorbit oder Xylit¹ in Lebensmitteln und anderen Probematerialien

Best. Nr. 10 670 057 035

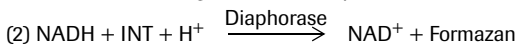
Test-Combination für 3 × ca. 12 Bestimmungen

Prinzip (Lit. 1)

D-Sorbit und Xylit werden in Gegenwart des Enzyms Sorbit-Dehydrogenase (SDH, auch Polyol-Dehydrogenase genannt) durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) zu D-Fructose bzw. D-Xylulose oxidiert, wobei reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) entsteht (1a, 1b).



Das Gleichgewicht der Reaktionen (1a, b) liegt auf der Seite von NAD und D-Sorbit bzw. Xylit. Es wird auf die Seite von D-Fructose bzw. D-Xylulose verschoben, indem das gebildete NADH in einer nachfolgenden Reaktion mit Jodnitro-tetrazoliumchlorid (INT) reagiert. Es bildet sich in einer irreversiblen Reaktion in Gegenwart von Diaphorase ein Formazan (2).



Die Absorption des Formazans wird im Maximum bei 492 nm gemessen.

Die Test-Combination enthält

1. Flasche 1 mit ca. 25 ml Lösung, zusammengesetzt aus: Kaliumphosphat/Triethanolamin-Puffer, pH ca. 8,6; Polidocanol.
2. Drei Flaschen 2 mit ca. 35 mg Lyophilisat, zusammengesetzt aus: Diaphorase, ca. 4 U; NAD, ca. 28 mg
3. Flasche 3 mit Jodnitrotetrazoliumchlorid-Lösung, ca. 2,5 ml
4. Drei Flaschen 4 mit Lyophilisat SDH, je ca. 25 U
5. Flasche 5 mit D-Sorbit-Testkontroll-Lösung zur Testkontrolle (Die Messung der Testkontroll-Lösung ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen.) Testkontroll-Lösung unverdünnt verwenden. (Verwendbar bis: s. Packungsetikett).

Herstellung der Lösungen

1. Inhalt der Flasche 1 unverdünnt verwenden.
2. Inhalt einer Flasche 2 mit 2,5 ml bidest. Wasser lösen.
3. Inhalt der Flasche 3 mit 6 ml bidest. Wasser verdünnen.
4. Inhalt einer Flasche 4 mit 0,6 ml bidest. Wasser lösen. Eine geringe Opaleszenz der Lösung stört die Bestimmung nicht.

Stabilität der Reagenzien

Lösung 1 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Lösung 1 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.

Der Inhalt der Flaschen 2 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Lösung 2 ist bei 2-8°C 1 Woche haltbar.

Lösung 2 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.

Der Inhalt der Flasche 3 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Lösung 3 ist bei 2-8°C 3 Monate, bei 20-25°C 1 Monat haltbar (dunkel gelagert).

Lösung 3 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.

Der Inhalt der Flaschen 4 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Lösung 4 ist bei 2-8°C 2 Wochen, bei -15 bis -25°C 4 Wochen haltbar.

Bestimmungsansatz

Wellenlänge: (Hg) 492 nm

Glasküvette²: 1,00 cm Schichtdicke;

Temperatur: 20-25°C;

Testvolumen: 3,050 ml;

Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette), gegen Wasser oder Leerwert

Probelösung: 0,4-10 µg D-Sorbit und/oder Xylit/Testansatz³ (in 0,100-2,000 ml Probevolumen)

¹ Bei Anwesenheit von D-Sorbit und Xylit wird die Summe beider Zuckeralkohole bestimmt.

² Anstelle von Glasküvetten sind auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.

³ Siehe Hinweise zur Testdurchführung

⁴ Bei Serienanalysen können die Lösungen 1, 2 und 3 vorgemischt werden. Von dieser Reagenzienmischung (bei 20-25°C im Dunkeln etwa 1 Stunde stabil) 1,000 ml zum Test einsetzen.

⁵ INT ist lichtempfindlich. Nach Zugabe von Lösung 3 dürfen Küvetten nicht im Licht stehen.

BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik

Nur zur Verwendung in der Lebensmittelhygiene.

Lagern bei 2-8°C

Methoden-Empfehlungen und standardisierte Verfahren siehe unter Literatur (2)

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Lösung 1 ⁴	0,600 ml	0,600 ml
Lösung 2 ⁴	0,200 ml	0,200 ml
Lösung 3 ^{4, 5}	0,200 ml	0,200 ml
Probelösung* bidest. Wasser	- 2,000 ml	0,100 ml 1,900 ml

mischen,** nach 2 min Extinktionen der Lösungen messen (E₁). Messung nach 2 min wiederholen.

Wenn eine Extinktionsänderung von grösser als 0,010 beobachtet wird, muss die Probe entsprechend Pkt. 7 (Entfernung reduzierender Verbindungen) vorbehandelt werden. Wird jedoch eine Extinktionsänderung von kleiner als 0,010 beobachtet, so ist eine Vorbehandlung der Probe entsprechend Pkt. 7 nicht erforderlich, wenn die Reaktion unmittelbar nach der letzten Extinktionsmessung gestartet wird durch Zugabe von

Lösung 4	0,050 ml	0,050 ml
----------	----------	----------

mischen**, Stillstand der Reaktion abwarten (ca. 30 min), Extinktionen der Lösungen messen (E₂).

Falls die Reaktion nach 30 min nicht zum Stillstand gekommen ist, Extinktionen weiter in 5 min-Abständen messen, bis eine konstante Extinktionszunahme pro 5 min erreicht ist.

* Vor der Dosierung der Probelösung Enzymtest-Messpipette bzw. Pipettenspitze der Kolbenhubpipette mit der Probelösung vorspülen.

** Z. B. mit Rührspatel oder durch Umschwenken nach Verschliessen z.B. mit Parafilm (Warenzeichen der American Can Company, Greenwich, Ct., USA).

Bei konstanter Extinktionszunahme von E₂ wird die Extinktion auf die Zeit der Zugabe von Lösung 4 (SDH) extrapoliert.

Für Leerwert und Probe Extinktionsdifferenzen (E₂-E₁) berechnen. Extinktionsdifferenz des Leerwertes von Extinktionsdifferenz der Probe abziehen.

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

Die gemessene Extinktionsdifferenz sollte zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Extinktionseinheiten betragen (s. "Hinweise zur Testdurchführung" und "Empfindlichkeit und Nachweisgrenze", Pkt. 4).

Berechnung

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

$$c = \frac{V \times MG}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E \text{ [g/l]}$$

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient von INT-Formazan bei 492 nm = 19,9 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]

Hieraus ergibt sich für D-Sorbit:

$$c = \frac{3,050 \times 182,17}{19,9 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E = 0,2792 \times \Delta E_{\text{D-Sorbit}} \text{ [g D-Sorbit/Probevolumen]}$$

für Xylit:

$$c = \frac{3,050 \times 152,15}{19,9 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E = 0,2332 \times \Delta E_{\text{Xylit}} \text{ [g Xylit/Probevolumen]}$$

Diese Berechnung gilt für die Fälle, bei denen entweder nur D-Sorbit oder nur Xylit in der Probe/ im Testansatz vorhanden ist.

Ist bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen worden, muss das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert werden.

Bei der Analyse fester und halbfester Proben, die für die Vorbereitung der Probe eingewägt werden, wird das Analysenergebnis auf die Einwaage bezogen:

$$\text{Gehalt}_{\text{D-Sorbit}} = \frac{c_{\text{D-Sorbit}} [\text{g/l Probelösung}]}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ in g/l Probelösung}} \times 100 [\text{g}/100 \text{ g}]$$

$$\text{Gehalt}_{\text{Xylit}} = \frac{c_{\text{Xylit}} [\text{g/l Probelösung}]}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ in g/l Probelösung}} \times 100 [\text{g}/100 \text{ g}]$$

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die D-Sorbit-Menge bzw. Xylit-Menge zwischen 0,4 und 10 µg liegen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit zu verdünnen, dass die Konzentration zwischen 0,01 und 0,10 g/l liegt.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge an D-Sorbit bzw. Xylit im Liter	Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor F
< 0,10 g	-	1
0,10-1,0 g	1 + 9	10
1,0-10 g	1 + 99	100
> 10 g	1 + 999	1000

Ist die gemessene Extinktionsdifferenz (ΔE) zu klein (z.B. < 0,100), so ist die Probelösung erneut herzustellen (höhere Einwaage oder weniger starke Verdünnung) oder das in die Küvette zu pipettierende Probevolumen (v) ist bis auf 2,000 ml zu erhöhen. In diesem Fall ist das Volumen der hinzuzufügenden Wassermenge entsprechend zu verringern, so dass in den Ansätzen für Probe und Leerwert das gleiche Testvolumen vorliegt. Das geänderte Probevolumen v ist in der Berechnungsformel entsprechend zu berücksichtigen.

2. Technische Hinweise

- 2.1 Bei Serienanalysen können die Lösungen 1, 2 und 3 vorgemischt werden. Die Mischung ist im Dunkeln aufbewahrt bei 20-25°C ca. 1 Stunde stabil. Zur Bestimmung 1,000 ml des Reagenziengemisches zum Test einsetzen.
- 2.2 Nach Zugabe von INT (Lösung 3 oder Reagenziengemisch) ist das Reaktionssystem lichtempfindlich (Tages- und Kunstlicht). Die Inkubation muss im Dunkeln erfolgen:
 - a) Bei Inkubation im Photometer Küvettenraum des Photometers und Lichtweg schliessen.
 - b) Küvetten mit lichtundurchlässigem Deckel abdecken oder in einem verschliessbaren Schrank aufbewahren.

3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

Sorbit-Dehydrogenase oxidiert neben D-Sorbit und Xylit auch andere Polyole, wie Idit, Allit und Ribit, wenn auch mit geringerer Geschwindigkeit. Weitere Polyalkohole, wie Mannit, Arabit, Dulcitol, werden nicht umgesetzt.

Glycerin wird unter vorgenannten Testbedingungen praktisch nicht oxidiert (weniger als 0,2% Umsatz bei 100 µg Glycerin/Ansatz. Bei höherer Enzymaktivität kann ein messbarer Umsatz beobachtet werden; siehe dazu Lit.1).

Bei der Analyse der Reinsubstanzen D-Sorbit und Xylit sind Ergebnisse von ca. 100% zu erwarten.

4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze (Lit. 1)

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen $v = 2,000$ ml einer D-Sorbit- bzw. Xylit-Konzentration von ca. 0,1 mg/l Probelösung (bei $v = 0,100$ ml entsprechend ca. 1,2 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von ca. 0,2 mg D-Sorbit bzw. Xylit/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,015 und dem maximalen Probevolumen $v = 2,000$ ml.

5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von 0,4 µg D-Sorbit bzw. Xylit/Ansatz (0,2 mg D-Sorbit bzw. Xylit/l Probelösung; Probevolumen $v = 2,000$ ml) bis 10 µg D-Sorbit bzw. Xylit/Ansatz (0,10 g D-Sorbit bzw. Xylit/l; Probevolumen $v = 0,100$ ml).

6. Präzision

Bei einer Doppelbestimmung, ausgehend von einer Probelösung, ist mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,005 bis 0,010 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probevolumen

$v = 0,100$ ml einer Konzentration von 1,5-3 mg D-Sorbit bzw. Xylit/l. (Ist bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen worden, ist mit dem Verdünnungsfaktor F zu multiplizieren. Bei einer Einwaage von 1 g Probe/100 ml = 10 g/l sind die zu erwartenden Unterschiede ca. 0,015-0,03 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten veröffentlicht:

D-Sorbit-Lösungen:

10 µg/Test	n = 15	VK = 1,6 %
30 µg/Test	n = 15	VK = 0,6 %
70 µg/Test	n = 15	VK = 1,0 %

Xylit-Lösungen:

4 µg/Test	n = 15	VK = 1,62 %
8 µg/Test	n = 15	VK = 1,62 % (Lit. 1.3)

Backwaren (s. Lit. 2.1):

x = 4,56 g/100 g n = 10	s = ± 0,149 g/100 g	VK = 3,27 %
x = 18,76 g/100 g n = 10	s = ± 0,283 g/100 g	VK = 1,51 %
x = 4,66 g/100 g n = 19	r = 0,22 g/100 g	R = 0,35 g/100 g
	r _{rel} = 4,72 %	R _{rel} = 7,51 %
x = 19,51 g/100 g n = 17	r = 0,64 g/100 g	R = 1,28 g/100 g
	r _{rel} = 3,28 %	R _{rel} = 6,56 %

7. Störungen

Hohe Konzentrationen an reduzierenden Substanzen, z. B. L-Ascorbinsäure in Fruchtsäften oder SO₂ in Früchten (Konfitüre), stören den Test, da sie mit INT reagieren und eine "Schleichreaktion" verursachen. Mehr als 5 µg L-Ascorbinsäure oder SO₂/Ansatz sollten daher durch Behandlung der Probe mit H₂O₂ und Alkali entfernt werden.

Hierzu Probe, welche - ggf. nach Verdünnen - etwa bis zu 5 mg D-Sorbit bzw. Xylit enthält, in einen 50 ml-Messkolben genau einwiegen (bzw. pipettieren). Mit Wasser auf ca. 40 ml auffüllen, 1 ml KOH (2 M) und 0,01 ml H₂O₂ (30%; w/v) hinzufügen. Lösung 10 min bei 70°C inkubieren. Nach Abkühlen auf 20-25°C mit Schwefelsäure (1 M) auf pH 7-8 einstellen. Mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen, filtrieren; Probelösung zum Test einsetzen.

D-Fruktose bis 1 mg/Ansatz und Butylenglycol bis 500 µg/Ansatz stören den Test nicht (Reaktionszeit: 60 min).

8. Erkennen von Störungen

8.1 Ist die Umsetzung von D-Sorbit bzw. Xylit nach der unter "Bestimmungsansatz" angegebenen Zeit beendet, so kann im allgemeinen auf einen störungsfreien Ablauf geschlossen werden.

8.2 Nach Ablauf der Reaktion kann durch Zugabe von D-Sorbit bzw. Xylit (qualitativ oder quantitativ) die Reaktion wieder gestartet werden: Die erneute Änderung der Extinktion nach Zugabe des Standardmaterials ist ein Beweis für den störungsfreien Ablauf der Bestimmung.

8.3 Grobe Fehler beim Testansatz und Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können auch erkannt werden, wenn aus einer Probelösung eine Doppelbestimmung mit verschiedenen Probevolumina (z.B. 0,100 ml und 0,200 ml) ausgeführt wird: Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein.

Bei der Analytik fester Proben wird die Einwägung verschiedener Mengen (z.B. 1 g und 2 g) in 100 ml-Messkolben empfohlen. Bei gleichen Probevolumina für die Testansätze muss Proportionalität zwischen Extinktionsdifferenz und Einwaage gegeben sein.

8.4 Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können weiterhin durch Mitführen eines internen Standards erkannt werden: Neben Probe-, Leerwert- und Standardansatz wird ein weiterer Ansatz mit Probe- und Testkontroll-Lösung analysiert. Aus den ermittelten Extinktionsdifferenzen wird die Wiederfindung berechnet.

8.5 Verluste während der Vorbereitung der Probe können durch Wiederfindungsversuche erkannt werden: Die Probe wird mit und ohne zugesetztem Standardmaterial vorbereitet und anschließend gemessen. Der Zusatz muss (innerhalb des Analysenfehlers) quantitativ wiedergefunden werden.

9. Gefährlichkeit der Reagenzien

Die Reagenzien zur Bestimmung von D-Sorbit/Xylit enthalten gefährliche Stoffe oder Zubereitungen im Sinne der Gefahrstoffverordnung, des Chemikaliengesetzes oder der EG-Richtlinien 67/548 und 99/45 und deren Änderungs- und Anpassungsrichtlinien. Weitere Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern und auf dem Etikett der betroffenen Flaschen.

10. Allgemeine Hinweise zur Vorbereitung der Proben

Flüssige, klare, farblose oder gefärbte und annähernd neutrale Proben direkt, nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle oder mit einem Probenvolumen bis 2,000 ml zum Test einsetzen;

trübe Lösungen filtrieren;

Kohlensäure-haltige Proben (z.B. durch Filtration) entgasen;

saure Proben mit Natronlauge oder Kalilauge auf ca. pH 8 einstellen;

feste und halb feste Proben zerkleinern oder homogenisieren, mit Wasser extrahieren bzw. lösen, wenn nötig filtrieren;

Protein-haltige Proben mit Carrez-Reagenzien klären oder mit Perchlorsäure enteiuweissen;

Fett-haltige Proben mit heissem Wasser extrahieren (Extraktionstemperatur über dem Schmelzpunkt des jeweiligen Fettes), zur Abscheidung des Fettes abkühlen lassen, Messkolben bis zur Marke auffüllen, 15 min in Eisbad stellen; alternativ nach Extraktion mit heissem Wasser mit Carrez-Reagenzien klären.

Carrez-Klärung:

Geeignete Probemenge in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, ca. 60 ml bidest. Wasser hinzufügen. Flüssige Probe in einem 100 ml-Messkolben, der ca. 60 ml bidest. Wasser enthält, pipettieren. Anschliessend 5 ml Carrez-I-Lösung (Kalium-hexacyanoferrat(II) (Ferrocyanid) 85 mM = 3,60 g $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$ ml) und 5 ml Carrez-II-Lösung (Zinksulfat, 250 mM = 7,20 g $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$ ml) sorgfältig dosieren. Mit Natronlauge (0,1 M; z.B. 10 ml) pH 7,5-8,5 einstellen. Nach jeder Zugabe mischen, Messkolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren.

11. Anwendungsbeispiele

Bestimmung von D-Sorbit bzw. Xylit in Fruchtsaft

5,0 ml schwarzen Johannisbeernektar, bzw. 1,0 ml Apfelsaft (trüben Apfelsaft vorher filtrieren) in einen 50 ml-Messkolben pipettieren. Nacheinander ca. 30 ml bidest. Wasser, 1 ml KOH (2 M) und 0,05 ml (bei Apfelsaft 0,02 ml) Wasserstoffperoxid-Lösung (30%; w/v) zugeben, mischen und 15 min bei 20-25°C stehen lassen. Anschliessend mit Schwefelsäure (1 M) auf pH ca. 8 einstellen. 2600 U Katalase⁶ zugeben, mischen und 10 min (Apfelsaft) bzw. 20 min (schwarzer Johannisbeernektar) stehen lassen. Messkolben mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren. Filtrat zum Test einsetzen.

Bestimmung von D-Sorbit bzw. Xylit in Diabetiker-Honig

Etwa 5 g Honig in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen und ca. 70 ml Wasser hinzufügen. 10 min bei ca. 70°C halten. Lösung abkühlen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Lösung gemäss Verdünnungstabelle verdünnen und zum Test einsetzen.

Bestimmung von D-Sorbit bzw. Xylit in Diabetiker-Konfitüre

Etwa 10 g Konfitüre im Mixer (Homogenisator) 2 min homogenisieren. Ca. 1 g der homogenen Masse in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, ca. 50 ml Wasser hinzufügen und 5 min bei ca. 60°C halten. Auf 20-25°C abkühlen lassen, mit Wasser auf 100 ml auffüllen. Mischen, filtrieren; Filtrat gemäss Verdünnungstabelle verdünnen und zum Test einsetzen.

Bestimmung von D-Sorbit bzw. Xylit in Speiseeis

Ca. 1 g Probe in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, etwa 60 ml Wasser hinzufügen und 15 min bei ca. 70°C halten. Kolben gelegentlich schwenken. Zur Klärung 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g Kaliumhexacyanoferrat(II), $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$ ml), 5 ml Carrez-II-Lösung (7,20 g Zinksulfat, $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$ ml) und 10 ml NaOH (0,1 M) hinzufügen, nach jeder Zugabe mischen, auf 20-25°C bringen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen, filtrieren. Klare, evtl. leicht trübe Lösung zum Test einsetzen, ggf. vorher verdünnen.

Bestimmung von D-Sorbit bzw. Xylit in Marzipan und Süswaren

Ca. 5 g der zerkleinerten und geriebenen Probe in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, mit etwa 60 ml Wasser versetzen und unter gelegentlichem Schütteln ca. 15 min bei ca. 60°C im Wasserbad halten. Mischung auf 20-25°C abkühlen lassen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Mischen und filtrieren, ggf. zentrifugieren. Klare Lösung ggf. verdünnen und zum Test einsetzen.

Bestimmung von D-Sorbit bzw. Xylit in Protein-haltigen Proben

Protein-haltige Probelösungen mit eiskalter Perchlorsäure (1 M) im Verhältnis 1:2 (1+1) enteiuweissen, dann zentrifugieren und Überstand mit KOH (1 M) neutralisieren.

⁶ aus Rinderleber (25°C, H₂O₂ als Substrat)

Bestimmung von D-Sorbit bzw. Xylit in Diabetiker-Schokolade

Ca. 3 g geriebene Schokolade in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, mit 70 ml Wasser versetzen und unter Schütteln im Wasserbad auf ca. 70°C erwärmen. Suspension auf 20-25°C abkühlen lassen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Messkolben 20 min zur Fettabscheidung in den Kühlschrank stellen. Lösung zentrifugieren (5 min bei ca. 5000 U/min). Klare, überstehende Lösung ggf. verdünnen, zum Test einsetzen.

Bestimmung von D-Sorbit bzw. Xylit in Diabetiker-Gebäck-Erzeugnissen

Etwa 10 g Gebäck-Erzeugnisse im Mörser oder Mixer zerkleinern und homogenisieren. Ca. 3 g Probe in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen und ca. 70 ml Wasser hinzufügen. Kolben 15 min im Wasserbad bei ca. 70°C halten. Nach dem Abkühlen auf 20-25°C mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Zur Fettabscheidung 20 min in den Kühlschrank stellen. Lösung etwa 5 min zentrifugieren (ca. 5000 U/min). Klarer Überstand, ggf. leicht trübe, gemäss Verdünnungstabelle verdünnen und zum Test einsetzen.

Bestimmung von D-Sorbit bzw. Xylit in Diabetiker-Puddingpulver

Inhalt eines Beutels (ca. 10-15 g) in einen 1 l-Erlenmeyerkolben genau einwiegen und mit ca. 500 ml Wasser versetzen. Mischung aufkochen und 2 min beim Sieden halten; nach dem Abkühlen in einen 1 l-Messkolben überspülen und bis zur Marke auffüllen. Nach dem Mischen einen Teil des Ansatzes zentrifugieren (ca. 5 min 5000 U/min). Klare, ggf. noch leicht trübe, überstehende Lösung gemäss Verdünnungstabelle verdünnen und zum Test einsetzen.

12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch anwendbar bei der Untersuchung von Pharmaka, Kosmetika, Papier und bei der Analytik von biologischen Proben. Zu Probenahme, Behandlung und Stabilität der Probe s. Lit. 1

Bestimmung von D-Sorbit bzw. Xylit in Fermentationsproben und Zellkulturmedien

Analysenprobe ggf. nach Zentrifugation zum Abstoppen enzymatischer Vorgänge 15 min in Wasserbad (80°C) stellen und anschliessend zentrifugieren. Überstand, ggf. gemäss Verdünnungstabelle verdünnt, zur Bestimmung einsetzen.

Gallertartige Agar-Medien mit Wasser homogenisieren und wie oben beschrieben weiterbehandeln.

Literatur

1. Bergmeyer, H. U., Gruber, W. & Gutmann, I. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1368-1371, Verlag Chemie, Weinheim, und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 3, p. 1323-1330, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York, London
2. Bässler, K.H. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1425-1428, Verlag Chemie, Weinheim, und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed., vol. 3, p. 1323-1330, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York, London
3. Beutler, H. O. & Becker, J. (1977) Enzymatische Bestimmung von D-Sorbit und Xylit in Lebensmitteln, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **6**, 182-187
4. Beutler, H.-O. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 484-490, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- 2.1 Beutler, H.-O. & Dresselhaus-Schroebler, M. (1993) Ringversuche zur Bestimmung von D-Sorbit in diätetischen Backwaren, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **89**, 349-351
- 2.2 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von D-Sorbit in Feinen Backwaren, 18.00-14 (Mai 1994)
- 2.3 Methodensammlung der Internationalen Fruchtsaft-Union (IFU-Analysen-Methode Nr. 62-1995); enthalten in "Code of Practice for Evaluation of Fruit and Vegetable Juices" (1996) edited by Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Economic Community (A.I.J.N.).

D-Sorbit-Testkontroll-Lösung (Flasche 5)

Konzentration: siehe Flaschenetikett

D-Sorbit-Testkontroll-Lösung ist eine stabilisierte wässrige Lösung von D-Sorbit. Sie dient als Testkontroll-Lösung für die enzymatische Bestimmung von D-Sorbit in Lebensmitteln und anderen Probematerialien.

Anwendung:

1. Zusatz der D-Sorbit-Testkontroll-Lösung zum Testansatz:

Die Testkontroll-Lösung wird anstelle der Probelösung zur Bestimmung eingesetzt.

2. "Quantitativer Nachstart":

Nach Ablauf der Reaktion mit Probelösung und Messung von E_2 werden 0,050 ml der Testkontroll-Lösung zum Probeansatz gegeben. Nach Ablauf der Reaktion (ca. 30 min) wird die Extinktion E_3 gemessen. Aus der Differenz ($E_3 - E_2$) wird nach der allgemeinen Berechnungsformel die Konzentration berechnet. Hierbei ist das geänderte Gesamtvolumen zu berücksichtigen. Wegen der Verdünnung des Testansatzes durch die Zugabe der Testkontroll-Lösung weicht das Ergebnis geringfügig von der Angabe des Flaschenetiketts ab.

3. Interner Standard:

Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung (keine groben Fehler bei Testansatz; Probe ist frei von Hemmsubstanzen) kann die Testkontroll-Lösung als interner Standard verwendet werden:

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe	Standard	Probe + Standard
Lösung 1	0,600 ml	0,600 ml	0,600 ml	0,600 ml
Lösung 2	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml
Lösung 3	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml
Probelösung	-	0,100 ml	-	0,050 ml
Testkontroll-Lsg.	-	-	0,100 ml	0,050 ml
bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	1,900 ml

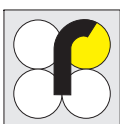
mischen, nach ca. 5 min Extinktionen der Lösungen messen (E_1). Weiter verfahren wie im Arbeitsschema bei "Bestimmungsansatz" angegeben. Die entsprechenden Fussnoten und "Hinweise zur Testdurchführung" sind zu beachten.

Die Wiederfindung des Standards berechnet sich nach:

$$\text{Wiederfindung} = \frac{2 \times \Delta E_{\text{Probe + Standard}} - \Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}} \times 100 [\%]$$

Weitere Hinweise siehe Arbeitsanleitungen zu

Test-Combination	D-Glucose	Best. Nr. 10 716 251 035
Test-Combination	D-Glucose/D-Fructose	Best. Nr. 10 139 106 035
Test-Combination	Saccharose/D-Glucose	Best. Nr. 10 139 041 035
Test-Combination	Saccharose/ D-Glucose/D-Fructose	Best. Nr. 10 716 260 035
Test-Combination	Stärke	Best. Nr. 10 207 748 035



R-BIOPHARM AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
Telefon + 49 61 51 / 81 02-0
Fax + 49 61 51 / 81 02-20
www.r-biopharm.com

