

# Stärke

## UV-Test

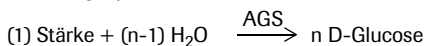
zur Bestimmung von nativer Stärke<sup>1</sup> und von Stärkepartialhydrolysaten in Lebensmitteln und anderen Probematerialien

**Best. Nr. 10 207 748 035**

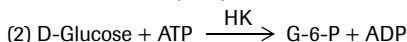
Test-Combination für 27 Bestimmungen

### Prinzip (Lit. 1)

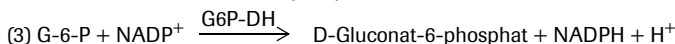
Stärke wird durch das Enzym Amyloglucosidase (AGS) bei pH 4,6 zu D-Glucose gespalten (1).



Die gebildete D-Glucose wird bei pH 7,6 mit den Enzymen Hexokinase (HK) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) bestimmt. D-Glucose wird mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP) in Gegenwart von Hexokinase zu D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) phosphoryliert unter gleichzeitiger Bildung von Adenosin-5'-diphosphat (ADP) (2).



G-6-P wird von Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADP) in Gegenwart von G6P-DH zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert, wobei reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADPH) entsteht (3).



Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der durch Hydrolyse der Stärke gebildeten D-Glucose-Menge proportional. NADPH ist Messgröße und wird aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm bestimmt.

### Die Test-Combination enthält

1. Flasche 1 mit ca. 100 mg Lyophilisat, zusammengesetzt aus: Citrat-Puffer, pH ca. 4,6; Amyloglucosidase, ca. 84 U
2. Flasche 2 mit ca. 5 g Pulvergemisch, zusammengesetzt aus: Triethanolamin-Puffer, pH ca. 7,6; NADP, ca. 75 mg; ATP, ca. 190 mg; Magnesiumsulfat
3. Flasche 3 mit ca. 0,7 ml Suspension, zusammengesetzt aus: Hexokinase, ca. 200 U; Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, ca. 100 U
4. Flasche 4 mit Stärke-Testkontroll-Substanz zur Testkontrolle (Zur Vorbereitung für die Analyse s. Pkt. 8.1: Einwaage ca. 50-100 mg/100 ml. Die Messung des Testkontroll-Materials ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen. Verwendbar bis: s. Packungsetikett)

### Herstellung der Lösungen

1. Inhalt der Flasche 1 mit 6,0 ml bidest. Wasser lösen.
2. Inhalt der Flasche 2 mit 27 ml bidest. Wasser lösen.
3. Inhalt der Flasche 3 unverdünnt verwenden.

### Stabilität der Reagenzien

Der Inhalt der Flasche 1 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).  
Lösung 1 ist bei 2-8°C 6 Wochen, bei -15 bis -25°C 3 Monate haltbar.  
Lösung 1 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.  
Der Inhalt der Flasche 2 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).  
Lösung 2 ist bei 2-8°C 4 Wochen, bei -15 bis -25°C 2 Monate haltbar.  
Lösung 2 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.  
Der Inhalt der Flasche 3 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

### Bestimmungsansatz

Wellenlänge<sup>2</sup>: 340 nm, Hg 365 nm oder Hg 334 nm  
Glasküvette<sup>3</sup>: 1,00 cm Schichtdicke  
Temperatur: 55-60°C (Inkubation);  
20-25°C (Messung)  
Testvolumen: 2,320 ml  
Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette) oder gegen Wasser  
Probelösung: 1,2-70 µg Stärke/Ansatz<sup>4</sup> (in 0,100-1,000 ml Probevolumen bzw. 0,100-0,200 ml bei DMSO-haltigen Lösungen)

Ist in der Probe freie D-Glucose vorhanden, und soll diese in der Analyse bestimmt werden, so ist eine getrennte D-Glucose-Bestimmung durchzuführen, z.B. nach Extraktion der Probe mit bidest. Wasser; bei Anwesenheit von Maltose und deren Homologen, sowie von Überschuss weiterer Oligosaccharide ist die Alkoholextraktion für die Bestimmung von Stärke auszuführen (s. dazu Hinweis Pkt. 8 und 9).

## 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	Reagenzien-Leerwert	Probe	Probe-Leerwert <sup>5</sup>
Lösung 1* Probelösung** bidest. Wasser	0,200 ml - 0,100 ml	0,200 ml 0,100 ml -	- 0,100 ml -
mischen*, 15 min bei 55-60°C inkubieren (Wasserbad). Hierbei Küvetten verschliessen (mit Deckel oder Parafilm). Zugabe von			
Lösung 2 bidest. Wasser	1,000 ml 1,000 ml	1,000 ml 1,000 ml	1,000 ml 1,200 ml
mischen*** nach ca. 3 min Extinktionen der Lösungen messen (E <sub>1</sub> ). Reaktion starten durch Zugabe von			
Suspension 3	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
mischen*** Stillstand der Reaktion abwarten (ca. 10-15 min) und Extinktionen der Lösungen messen (E <sub>2</sub> ). Falls die Reaktion nach 15 min nicht zum Stillstand gekommen ist, Extinktionen weiter in 2 min-Abständen messen, bis eine konstante Extinktionszunahme pro 2 min erreicht ist.			

\* Lösung 1, bidest. Wasser und Probelösung jeweils auf den Boden der Küvette pipettieren, durch Schütteln mischen. Bei Verwendung eines Rührspatels diesen erst unmittelbar vor der Extinktionsmessung E<sub>1</sub> aus der Küvette nehmen.

\*\* 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)

Wurden bei E<sub>2</sub> konstante Extinktionszunahmen festgestellt, werden die Extinktionen auf die Zeit der Zugabe von Suspension 3 (HK/G6P-DH) extrapoliert.

Für Reagenzienleerwert und Probe Extinktionsdifferenzen (E<sub>2</sub>-E<sub>1</sub>) berechnen. Extinktionsdifferenz des Reagenzienleerwertes von Extinktionsdifferenz der Probe abziehen.

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

### Zum Probeleerwert s. Pkt. 8.1 und 9

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. 3).

### Berechnung

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

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

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]  
(für Stärke = MG<sub>D-Glucose</sub> - MG<sub>H<sub>2</sub>O</sub> = 162,1)

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient von NADPH bei:  
340 nm = 6,3 [l × mmol<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>]  
Hg 365 nm = 3,5 [l × mmol<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>]  
Hg 334 nm = 6,18 [l × mmol<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>]

- 1 Modifizierte Arten von Stärke (phosphorylierte oder oxidierte) werden nicht erfasst.
- 2 Das Absorptionsmaximum von NADPH liegt bei 340 nm. Bei Verwendung von Spektralphotometern wird im Absorptionsmaximum, bei Verwendung von Spektral-Linienphotometern mit Hg-Dampflampe bei einer Messstrahlung von 365 nm oder 334 nm gemessen.
- 3 Anstelle von Glasküvetten sind auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.
- 4 S. Hinweise zur Testdurchführung
- 5 S. Hinweise zur Vorbereitung der Probe, Pkt. 8 und Pkt. 9



Hieraus ergibt sich für Stärke:

$$c = \frac{2,320 \times 162,1}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E = \frac{3,761}{\varepsilon} \times \Delta E \text{ [g Stärke/l Probelösung]}$$

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 Analyseergebnis auf die Einwaage bezogen:

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

## 1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Stärke-Menge zwischen 2,5 µg und 70 µg (Messung bei 365 nm) bzw. 1,2 µg und 40 µg (Messung bei 340, 334 nm) betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit zu verdünnen, dass die Stärkekonzentration zwischen 0,06 und 0,7 g/l bzw. 0,03 und 0,4 g/l liegt.

### Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge Stärke im Liter		Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor F
Messung bei			
340 oder 334 nm	365 nm		
< 0,4 g	< 0,7 g	-	1
0,4-4,0 g	0,7-7,0 g	1 + 9	10
4,0-40 g	7,0-70 g	1 + 99	100
> 40 g	> 70 g	1 + 999	1000

Ist die gemessene Extinktionsdifferenz ( $\Delta E$ ) 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 1,000 ml zu erhöhen (Lösung in Wasser). 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.

**Hinweis:** Nach dem Lösen von Stärke mit DMSO und HCl werden sofort 0,100 ml (maximal 0,200 ml) Probelösung zum Test eingesetzt (s.Pkt. 8.1).

## 2. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

Amyloglucosidase hydrolysiert  $\alpha$ -1,4- und  $\alpha$ -1,6-Glucan-Bindungen in Polysacchariden, wie z.B. Amylose, Amylopektin, Stärke, Dextrin, Glykogen und eine Reihe von Glucosyl-Oligosacchariden (Maltose, Maltotriose etc.).

Eine Unterscheidung zwischen "hochpolymerer" und "niedermolekularer" Stärke ist enzymatisch nicht möglich. Eine Problemlösung besteht im Waschen der Probe mit Ethanol/Wasser-Mischungen: Stärke ist in Ethanol-Wasser-Mischungen (das Verhältnis Ethanol : Wasser ist für die analytische Methode festzulegen) nicht löslich, während Oligosaccharide löslich sind. Zu beachten ist, dass die Löslichkeit von Oligosacchariden mit zunehmender Ethanol-Konzentration abnimmt.

Die Messung der D-Glucose ist spezifisch.

Bei der Analyse reiner Stärke sind Ergebnisse von ca. 99% (bezogen auf die wasserfreie Trockenmasse) zu erwarten.

## 3. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze (Lit. 1.3)

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,010 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen  $v = 1,000$  ml und Messung bei 340 nm einer Stärke-Konzentration von 0,6 mg/l Probelösung (bei  $v = 0,100$  ml entsprechend 6 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von 1,2 mg/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,020 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probevolumen  $v = 1,000$  ml.

**Hinweis:** Nach Vorbereitung der Probe mit DMSO und HCl beträgt das maximal einzusetzende Probevolumen 0,200 ml (s. Pkt. 8.1).

## 4. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von 1,2 µg Stärke/Ansatz (1,2 mg Stärke/l Probelösung; Probevolumen 1,000 ml) bis 70 µg Stärke/Ansatz (0,7 g Stärke/l Probelösung; Probevolumen  $v = 0,100$  ml).

**Hinweis:** Nach Vorbereitung der Probe mit DMSO und HCl beträgt das maximal einzusetzende Probevolumen 0,200 ml (s. Pkt. 8.1).

## 5. Präzision

Bei einer Doppelbestimmung, ausgehend von einer Probelösung, ist mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,010 bis 0,015 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probevolumen  $v = 0,100$  ml und Messung bei 340 nm einer Stärke-Konzentration von ca. 6-10 mg/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 erwartende Unterschiede ca. 0,06-0,1 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten veröffentlicht:

Stärke:

21,4 µg/Test	n = 18	VK = 1,60 %
53,5 µg/Test	n = 18	VK = 0,51 %
85,6 µg/Test	n = 16	VK = 1,73 %

(Lit. 1.2)

Fleischwurst:

$x = 1,3$ g/100 g	$r = 0,170$ g/100 g	$s_{(r)} = \pm 0,060$ g/100 g
	$R = 0,217$ g/100 g	$s_{(R)} = \pm 0,077$ g/100 g

Kinder-Zwieback:

$x = 43,5$ g/100 g	$r = 2,33$ g/100 g	$s_{(r)} = \pm 0,82$ g/100 g
	$R = 8,42$ g/100 g	$s_{(R)} = \pm 2,97$ g/100 g

Weitere Daten s. Literatur

(Lit. 2.6)

## 6. Erkennen von Störungen

6.1 Ist die Umsetzung von D-Glucose nach enzymatischer Hydrolyse von Stärke nach der unter "Bestimmungsansatz" angegebenen Zeit beendet, so kann im allgemeinen auf einen störungsfreien Ablauf geschlossen werden.

6.2 Nach Ablauf der Reaktion kann durch Zugabe von D-Glucose (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.

*Ein Nachstart der Reaktion mit "löslicher" Stärke ist nicht möglich, da nach Änderung der Reaktionsbedingungen von pH 4,6 auf pH 7,6 ("Umpufferung") Stärke nicht mehr gespalten wird.*

6.3 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. 1g und 2g) in 100 ml-Messkolben empfohlen. Bei gleichen Probevolumina für die Testansätze muss Proportionalität zwischen Extinktionsdifferenz und Einwaage gegeben sein.

6.4 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.

6.5 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.

## 7. Gefährlichkeit der Reagenzien

Die Reagenzien zur Bestimmung von Stärke (nach Lösen mit DMSO/HCl oder Autoklavieren, bzw. nach alkalischer oder saurer Hydrolyse) sind keine gefährlichen Stoffe oder Zubereitungen im Sinne der Gefahrstoffverordnung, des Chemikaliengesetzes oder der EG-Richtlinie 67/548/EWG und deren Änderungs- und Anpassungsrichtlinien. Die beim Umgang mit Chemikalien üblichen Vorsichtsmassnahmen sollten jedoch beachtet werden.

Nach Gebrauch können die Reagenzien unter Beachtung der örtlichen Vorschriften zum Abwasser gegeben werden. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

## 8. Hinweise zur Vorbereitung der Proben

**8.1 Lösen von Stärke mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Salzsäure** (Stärkepräparate, Mehle, Backwaren, Frikadellen und sonstige Fleisch-Erzeugnisse, Milchprodukte, Margarine, Tierfutter, u. ä.).

Stärke oder stärkehaltige Proben müssen vor der Bestimmung vorbehandelt und Stärke in eine lösliche Form überführt werden. Wegen der einfachen Handhabung wird die Verwendung von Dimethylsulfoxid (DMSO) und Salzsäure empfohlen:

Die Probe ggf. in einer Pulvermühle, einem Homogenisator, o. ä. fein

zerkleinern. Bei festen Proben diese danach durch ein Sieb von 0,2 mm lichter Maschenweite geben. 100 mg bis 1 g zerkleinerter Probe, die bis zu 70 mg Stärke enthält, in einen 100 ml Erlenmeyerkolben genau einwiegen. 20 ml Dimethylsulfoxid und 5 ml Salzsäure (8 M) hinzufügen. (Bei fetthaltigen Proben empfiehlt sich erst die DMSO-Zugabe, bei fettfreien bzw. fettarmen Proben dagegen erst die HCl-Zugabe.) Kolben z.B. mit Parafilm verschliessen und 30 min (gelegentlich 60 min, z.B. wenn Paniermehl zur Herstellung von Frikadellen verwendet wurde) im Wasserbad bei 60°C inkubieren (Schüttelwasserbad oder beheizbarer Magnetrührer; es ist darauf zu achten, dass keine Verklumpung eintritt; ggf. mit Glasstab zerdrücken).

Rasch auf 20-25°C abkühlen, ca. 50 ml Wasser zugeben und mit Natronlauge (5 M; 1 M zur Feineinstellung) unter kräftigem Schütteln auf pH 4-5 einstellen (nicht höher, mit pH-Meter kontrollieren). Mischung in einen 100 ml-Messkolben überführen, mit Wasser nachspülen und bis zur Marke auffüllen. Lösung, wenn nötig, filtrieren (Filterpapier vorher mit siedend heissem bidest. Wasser waschen). Alternativ zur Filtration kann man den Messkolben einige Minuten stehen lassen und die Probelösung vom oberen Teil der Flüssigkeit mit einer Kolbenhubpipette nehmen. Eine Zentrifugation kann nicht empfohlen werden, da wegen der Ausfällung von Stärke zu niedrige Ergebnisse erhalten werden.

**Sofort 0,100 ml (max. 0,200 ml) unverdünnt zum Test einsetzen (Probe und Probeerwert).**

$$\Delta E_{\text{Stärke}} = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Probeerwert}}$$

Unter den angegebenen Bedingungen wird aus Stärke keine D-Glucose freigesetzt.

**Hinweis:** Unter den Bedingungen des Lösens von Stärke mit DMSO und Salzsäure wird Saccharose vollständig, werden Lactose und Maltose zu ca. 10% in die Monosaccharide gespalten. D-Fructose wird bis zu ca. 60% abgebaut (Lit. 1.2). Aus diesem Grund dient die Extinktionsdifferenz des Probeerwertes ausschliesslich zum Abzug von der Extinktionsdifferenz des Probeansatzes bei der Berechnung von Stärke (und nicht zur Berechnung des D-Glucose- und D-Fructose-Gehaltes).

Zur Vereinfachung der Vorbereitung der Probe kann auch wie folgt vorgegangen werden (Lit. 3.8):

Nach Behandlung mit DMSO und HCl Lösung auf 20-25°C bringen, 5 ml NaOH (8 M) zusetzen, in 100 ml-Messkolben überführen und mit Citrat-Puffer (0,112 M; pH 4; hergestellt durch Mischen von Citronensäurelösung (0,112 M) und Natriumcitratlösung (0,112 M)), nachspülen und Messkolben bis zur Marke auffüllen. (Eine pH-Wert-Einstellung ist damit nicht mehr erforderlich.)

**Hinweis:** Dimethylsulfoxid, DMSO (nicht zu verwechseln mit dem sehr giftigen Dimethylsulfat), ist ein schwach wassergefährdender Stoff. Die LD50 oral rat beträgt 14,5 g/kg. Die Berührung mit Haut und Augen ist zu vermeiden.

## 8.2 Alkalischer und enzymatischer Aufschluss von Stärke (Lit. 2.4, 3.4-3.6)

Als Stärke werden alle  $\alpha$ -Glucane bezeichnet, welche in Ethanol (40% v/v) unlöslich sind und durch Amyloglucosidase zu D-Glucose abgebaut werden. Unter Stärkeabbauprodukten versteht man Maltodextrine, Glucose- und Stärke-Sirup und teilweise Dextrine, die in Ethanol (40% v/v) löslich sind und die ebenfalls durch Amyloglucosidase zu D-Glucose abgebaut werden.

Das Probematerial wird zur Entfernung von Zucker und Stärkeabbauprodukten mit Ethanol (40% v/v) gewaschen, der Rückstand wird mit Natronlauge aufgeschlossen und die Stärke mit Amyloglucosidase zu D-Glucose abgebaut.

### Reagenzien

Ethanol (40% v/v),  
Natronlauge, 0,5 M,  
Amyloglucosidase (AGS)-Lösung (10 mg Lyophilisat, entsprechend 60 U, Best.-Nr. 11 202 332, bzw. 11 202 367, vor Gebrauch in 1 ml bidest. Wasser lösen)

Acetat-Puffer pH 4,6 (70 ml NaOH, 0,5 M, mit 950 ml bidest. Wasser verdünnen und mit Eisessig auf pH 4,6 einstellen) (Nur zur Bestimmung der Stärkeabbauprodukte)

Probematerial, das bis zu 100 mg Stärke enthält, in ein Zentrifugenglas genau einwiegen, mit 50 ml Ethanol (40% v/v) versetzen und bei 20-25°C 20 min rühren. Magnetrührer im Zentrifugenglas belassen und 5 min mit Laborzentrifuge zentrifugieren. Überstand mit Wasserstrahlpumpe und Pasteurpipette vorsichtig absaugen und zur Bestimmung der löslichen Stärkeabbauprodukte und von freier D-Glucose verwenden. Rückstand noch mindestens zweimal mit je 25 ml Ethanol (40% v/v) durch Aufrühren waschen und zentrifugieren. Überstand jeweils absaugen und mit vorherigem Überstand vereinigen.

Rückstand mit 50 ml NaOH (0,5 M) versetzen und 30 min im Wasserbad bei 60°C rühren. pH-Wert der Lösung mit Eisessig (mind. 96%) auf 4,6-4,8 einstellen. Anschliessend 1 ml AGS-Lösung zugeben und weitere 30 min

unter Rühren inkubieren. Lösung auf 20-25°C abkühlen lassen, in 100 ml-Messkolben überführen, mit Wasser nachspülen, Messkolben bis zur Marke mit Wasser auffüllen und mischen. Lösung, wenn nötig, filtrieren.

### filtrat zur Bestimmung von D-Glucose einsetzen (s. unten) und Ergebnis als Stärke berechnen.

Zur Bestimmung der Stärkeabbauprodukte die gesammelten Extrakte am Rotationsverdampfer bis zum Auftreten einer Trübung einengen. Lösung in 100 ml-Messkolben überführen, mit Acetat-Puffer pH 4,6 nachspülen und Messkolben bis zur Marke auffüllen.

Die Durchführung der Bestimmung der Stärkehydrolyseprodukte erfolgt wie bei "Bestimmungsansatz" beschrieben (Probeerwert und Probe). Die Berechnung der gesamten Stärkeabbauprodukte (ohne "freie D-Glucose") kann als "Stärke" erfolgen.

Der Anteil an "freier D-Glucose" kann, wie unten beschrieben, bestimmt werden (siehe auch Pkt. 10).

### Bestimmung von D-Glucose<sup>7</sup>

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Lösung 2 aus TC-Stärke	1,000 ml	1,000 ml
Probelösung	-	0,100 ml
bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml

mischen, nach ca. 3 min Extinktionen der Lösungen messen ( $E_1$ ). Reaktion starten durch Zugabe von

Suspension 3 aus TC-Stärke	0,020 ml	0,020 ml
----------------------------	----------	----------

mischen, Stillstand der Reaktion abwarten (ca. 10-15 min) und Extinktionen der Lösungen messen ( $E_2$ ).

Falls die Reaktion nach 15 min nicht zum Stillstand gekommen ist, Extinktionen weiter in 2 min-Abständen messen, bis konstante Extinktionszunahme pro 2 min erreicht ist.

Wurden bei  $E_2$  konstante Extinktionszunahmen festgestellt, werden die Extinktionen auf die Zeit der Zugabe von Suspension 3 (HK/G6P-DH) extrapoliert.

Für Leerwert und Probe Extinktionsdifferenzen ( $E_2 - E_1$ ) berechnen. Extinktionsdifferenz des Leerwertes von Extinktionsdifferenz der Probe abziehen. Man erhält  $\Delta E_{\text{Stärke}}$  bzw. freie D-Glucose

$$\Delta E_{\text{Stärke}} \text{ bzw. freie D-Glucose} = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

Es ergibt sich für Stärke:

$$c = \frac{3,020 \times 162,1}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E_{\text{Stärke}} = \frac{4,895}{\epsilon} \times \Delta E_{\text{Stärke}} \left[ \frac{\text{g Stärke/l}}{\text{Probelösung}} \right]$$

für freie D-Glucose:

$$c = \frac{3,020 \times 180,16}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E_{\text{freie D-Glucose}} = \frac{5,441}{\epsilon} \times \Delta E_{\text{freie D-Glucose}} \left[ \frac{\text{g freie D-Glucose/l}}{\text{Probelösung}} \right]$$

### 8.3 Saure Hydrolyse von Stärke (Lit. 2.3)

#### Reagenzien

Ethanol (40% v/v), Salzsäure, 32% (m/m), Natronlauge, 5 M

#### a) Pulverförmige (trockene) Probematerialien

Probe, die bis zu 70 mg Stärke enthält, in ein Zentrifugenglas genau einwiegen und dreimal mit je 15 ml Ethanol (40% v/v) für jeweils 20 min unter Rühren extrahieren. Anschliessend jeweils mit Laborzentrifuge zentrifugieren und Überstand absaugen. Den Rückstand mit 10 ml Salzsäure (1 Teil HCl, 32%; m/m mit 2 Teilen Wasser verdünnt) versetzen und 60 min im Wasserbad bei 60°C rühren. Die Lösung quantitativ in ein 100 ml-Becherglas überspülen, mit etwas Wasser nachspülen und pH-Wert der Lösung mit NaOH (5 M) auf 4,5 einstellen. Die Flüssigkeit in einen 100 ml-Messkolben überspülen. Messkolben mit Wasser bis zu Marke auffüllen, mischen. Lösung, wenn nötig, filtrieren.

#### b) Wasserhaltige Proben

Probe, die bis zu 70 mg Stärke enthält, in ein Zentrifugenglas genau einwiegen. Mit 10 ml Ethanol (96% v/v) unter Rühren extrahieren, mit Laborzentrifuge zentrifugieren. Weiterverfahren wie unter a) beschrieben (einschliesslich dreimaliger Extraktion mit je 15 ml Ethanol (40% v/v)).

**Die Durchführung der Bestimmung von Stärke erfolgt wie bei "Bestimmungsansatz" beschrieben (Reagenzien-Leerwert und Probe).**

$$\Delta E_{\text{Stärke}} = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Reagenzienleerwert}}$$

6 Zu beziehen von Roche Applied Science

7 Die Bestimmung von D-Glucose kann auch durchgeführt werden mit Test-Combination D-Glucose, Cat. No. 10 716251 035

### 8.4 Autoklav-Verfahren zum Aufschluss von Stärke



## Reagenzien

Acetat-Puffer (2 M; pH 4,8: 120 ml Essigsäure und 164 g wasserfreies Natrium-acetat werden zu 1 l gelöst)

Amyloglucosidase (AGS)-Lösung (10 mg Lyophilisat, entsprechend 60 U, Best.-Nr. 1 202 332<sup>6</sup>, bzw. 1 202 367<sup>6</sup>, vor Gebrauch in 1 ml bidest. Wasser lösen)

Proben, die freie D-Glucose oder Oligo-glucoside enthalten, werden wie bei 8.2 und 8.3 beschrieben mit Ethanol gewaschen.

Probe, die bis zu 70 mg Stärke enthält, in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben genau einwiegen, 25 ml Wasser hinzufügen, mit dem Bunsenbrenner erhitzen und 3 min kochen. Anschliessend Erlenmeyerkolben mit Aluminiumfolie verschliessen und 1 Stunde bei 130°C und 1,8 kg × cm<sup>-2</sup> autoklavieren. Zur Lösung nach Abkühlen auf 20-25°C 2,5 ml Acetat-Puffer, 22,5 ml Wasser und 5 ml AGS-Lösung geben. Anschliessend im Wasserbad mit Schüttel-einrichtung 2 Stunden bei 60°C inkubieren. Danach Inhalt des Erlenmeyer-Kolbens in einen 100 ml-Messkolben überführen, mit Wasser nachspülen und Messkolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen.

**Die Durchführung der Bestimmung der Stärke erfolgt wie bei "Bestimmungsansatz" beschrieben (Reagenzien-Leerwert und Probe).**

$$\Delta E_{\text{Stärke}} = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Reagenzienleerwert}}$$

## 9. Gleichzeitige Anwesenheit von Mono- oder Oligosacchariden

Enthält die Probe freie D-Glucose bzw. Saccharose (die durch den DMSO/HCl-Aufschluss gespalten wird), so ist die Probelösung nach Behandlung der Probe mit DMSO und HCl (gem. Pkt. 8.1) in einem weiteren Reaktionsansatz **ohne** Inkubation mit Amyloglucosidase zu messen (**Probeleerwert und Probe-Ansatz**).

**Die gemessene Extinktionsdifferenz (E<sub>2</sub>-E<sub>1</sub>)<sub>Probeleerwert</sub> ist von der Extinktionsdifferenz der Probe abzuziehen.**

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

**Das Mitführen eines Reagenzien-Leerwertes kann entfallen.**

Bei Anwesenheit von Maltose oder deren Homologen muss stets die Alkohol-Extraktion vorgenommen werden, da Maltose unter den Bedingungen des Lösens von Stärke mit DMSO und HCl teilweise hydrolysiert und ebenfalls von Amyloglucosidase gespalten wird.

Von der ggf. zerkleinerten und gesiebten Analysenprobe, deren Wassergehalt zu bestimmen ist und der nicht über 20% beträgt (wasserreichere Proben vorher trocknen), 100 mg bis 1 g (enthaltend bis zu 70 mg Stärke) genau in einen 100 ml Zentrifugenbecher einwiegen. Die Probe dreimal mit je 10 ml Ethanol, 40% (v/v), waschen und zentrifugieren. Den Überstand filtrieren, Filtrat verwerfen. Den Rückstand aus dem Zentrifugenbecher und vom Filter quantitativ mit 4 × 5 ml Dimethylsulfoxid in einen 100 ml Erlenmeyer-Kolben überführen, 5 ml Salzsäure (8 M) hinzufügen und wie bei Pkt. 8.1. weiterverfahren.

**In diesem Fall kann die gesonderte Probeleerwert-Bestimmung entfallen, hingegen ist der Reagenzien-Leerwert zu bestimmen.**

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

## 10. Bestimmung von Stärke-Partialhydrolysaten

### a) Dextrine in Bier

Bei der Bestimmung von Dextrinen in Bier ist der Probeaufschluss mit Dimethylsulfoxid nicht erforderlich. Die Probelösung kann mit einem Probevolumen von 0,100 ml (ggf. bis zu 1,000 ml) direkt zum Test eingesetzt werden: Probeleerwert und Probe.

Die Berechnung der Dextrin-Konzentration erfolgt nach Abzug ggf. vorhandener freier D-Glucose (= Probeleerwert) als Stärke.

$$\Delta E_{\text{Dextrin}} = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Probeleerwert}}$$

$$\Delta E_{\text{freie D-Glucose}} = (E_2 - E_1)_{\text{Probeleerwert}} - (E_2 - E_1)_{\text{Reagenzienleerwert}}$$

### b) Lösungen, die Stärkepartialhydrolysate enthalten

Die Bestimmung erfolgt wie bei der Bestimmung von Dextrin in Bier angegeben. Die Lösungen werden gemäss der Verdünnungstabelle verdünnt, so dass die Konzentration an Oligoglucosiden bis zu 0,4 g/l (Messung bei 340, Hg 334 nm), bzw. 0,7 g/l (Messung bei Hg 365 nm) beträgt. (Ansätze Probe und Probeleerwert ausführen). Für die Bestimmung von D-Glucose Lösung verdünnen, so dass die Konzentration an D-Glucose bis zu 0,4 g/l (Messung bei 340, Hg 334 nm), bzw. bis zu 0,7 g/l (Messung bei Hg 365 nm) beträgt. (Ansätze Probeleerwert und Reagenzienleerwert ausführen.)

### c) "Glucosesirup" in Fruchtsäften

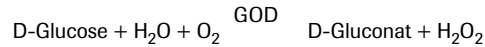
In der Regel enthalten Fruchtsäfte im Vergleich zur Konzentration an Glucosesirup (Stärke) erhebliche Überschüsse an D-Glucose. Zur

Bestimmung wird mit der Probelösung direkt - also ohne Aufschluss mit Dimethylsulfoxid - die Stärkebestimmung gemäss "Bestimmungsansatz" ausgeführt (=Stärkeprobe). Die Hydrolyse der Stärkeprobe mit Amyloglucosidase erfolgt 30 min bei 25-25°C. In einem weiteren Ansatz wird die D-Glucose **ohne** Amyloglucosidase bestimmt (D-Glucose-Probe, entspricht Probeleerwert bei der Stärkebestimmung).

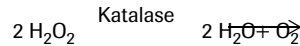
$$\Delta E_{\text{Glucosesirup}} * = (E_2 - E_1)_{\text{Stärkeprobe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Probeleerwert}}$$

Ist das Verhältnis D-Glucose zu Glucosesirup grösser als z.B. 10 : 1, so ist die Präzision der Bestimmung von Glucosesirup beeinträchtigt. Zur Erzielung einer höheren Präzision der Messung muss daher die D-Glucose in der Probelösung vor der eigentlichen Bestimmung weitgehend entfernt werden.

In Gegenwart von Glucose-Oxidase (GOD) und Luftsauerstoff wird D-Glucose zu D-Gluconat oxidiert:



Wasserstoffperoxid wird durch Katalase zerstört:



## Reagenzien

Glucose-Oxidase (GOD) aus *Aspergillus niger*, 200 U/mg (25°C; D-Glucose als Substrat); Amylase und β-Fruktosidase je < 0,01%

Katalase

Triethanolamin-hydrochlorid

MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O

NaOH, 4 M

## Herstellung der Lösungen für 10 Bestimmungen

Enzymlösung:

5 mg (Δ ca. 1000 U) GOD mit 0,750 ml bidest. Wasser lösen, 325 KU Katalase (aus Rinderleber; 25°C, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat) zugeben, mischen.

Pufferlösung:

5,6 g Triethanolamin-hydrochlorid und 0,1 g MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O mit 80 ml Wasser lösen, mit Natronlauge (4 M) auf pH 7,6 einstellen und mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

## Stabilität der Lösungen

Die Enzymlösung ist täglich vor Gebrauch frisch herzustellen.

Die Pufferlösung ist bei 2-8°C 4 Wochen haltbar.

## Durchführung der D-Glucose-Oxidation

In 10 ml-Messkolben pipettieren	
Pufferlösung	2,000 ml
Probelösung (mit ca. 1% D-Glucose)	5,000 ml
Enzymlösung	0,100 ml
1 Stunde lang Luft (O <sub>2</sub> ) durch die Mischung leiten, während der Oxidation <b>pH-Wert mit Indikatorpapier überprüfen und ggf. mit NaOH die gebildete Säure neutralisieren.</b>	

Zur Inaktivierung der Enzyme GOD und Katalase Messkolben 15 min in siedendes Wasser stellen, abkühlen lassen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Mischen, ggf. filtrieren. Die klare Lösung zur Bestimmung von Glucosesirup und Rest-D-Glucose einsetzen.

## d) "Stärkesirup" in Konfitüre mit hohem Saccharosegehalt

Zur Bestimmung von Stärkesirup neben extrem hohen Saccharosekonzentrationen wird empfohlen, die homogenisierte Probe gemäss den Aufschlussbedingungen mit Dimethylsulfoxid/Salzsäure vorzubereiten (s. Pkt. 8.1).

Hierbei wird die in der Probe enthaltene Saccharose vollständig zu D-Glucose und D-Fruktose gespalten. Die bei dieser Vorbereitung der Probe entstehende überschüssige D-Glucose sollte - um eine bessere Präzision zu erzielen - weitgehend entfernt werden, wie unter Pkt. 10 b angegeben.

Zur Testdurchführung können bis zu 5 g Probe eingewägt werden.

Die Bestimmung erfolgt wie unter "Bestimmungsansatz" angegeben: Ansätze Probeleerwert und Probe ausführen.

$$\Delta E_{\text{Stärkesirup}} = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Probeleerwert}}$$

\* Glucosesirup als Stärke berechnet

## 11. Bestimmung von modifizierter Stärke

Modifizierte Stärke, z.B. phosphorylierte oder auch oxidierte Stärke, ist in begrenztem Umfang bestimmbar. Bis zu einem Modifizierungsgrad von 1%

(wenn also 1% der im Stärkemolekül enthaltenen D-Glucosebausteine derivatisiert sind) hydrolysiert die Amyloglucosidase die modifizierte Stärke. Die freigesetzte D-Glucose kann in üblicher Weise gemessen werden. Die derivatisierten D-Glucosebausteine werden hingegen nicht umgesetzt.

Modifizierte Stärke mit einem höheren Modifizierungsgrad wird von der Amyloglucosidase nicht mehr als spaltbares Substrat erkannt.

## 12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

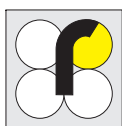
Die Methode ist auch anwendbar bei der Untersuchung von Papier (s. Lit. 2.2) und in der Forschung bei der Analytik biologischer Proben. Zu Probenahme, Behandlung und Stabilität der Probe s. Literatur 1.1 und 1.4

## Literatur

- 1.1 Keppler, D. & Decker, K. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1171-1176, Verlag Chemie, Weinheim und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1127-1131, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
- 1.2 Beutler, H.-O. (1978) Enzymatische Bestimmung von Stärke in Lebensmitteln mit Hilfe der Hexokinase-Methode, *Starch/Stärke* **30**, 309-312
- 1.3 Beutler, H.-O. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 2-10, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- 1.4 Keppler, D. & Decker, K. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 11-18, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- 2.1 Nederlandse Norm NEN 3574 (Dezember 1974) Onderzoekingsmethoden voor veevoeders; Bepaling van het gehalte aan zetmeel met behulp van enzymatische hydrolyse (Test methods for feeding stuffs; Determination of the starch content by enzymatic hydrolysis)
- 2.2 Untersuchung von Papieren, Kartons und Pappen für Lebensmittelverpackungen (gem. Empfehlung XXXVI der Kunststoffkommission des Bundesgesundheitsamtes) Kapitel 8 (Methoden), Pkt. 3.4.1 (März 1979)
- 2.3 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau **77**, S. 3 (D-Glucose), Oligosaccharide (11-12) und 12-13 (Stärke)
- 2.4 Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 22 (Diätetische Lebensmittel)/6.1: Bestimmung der Stärke und Stärkeabbauprodukte (1982), Kapitel 12 (Fleischextrakte, Bouillonpräparate, Sulzen)/11 (1981), Kapitel 13 (Wurzeln, Suppen, Saucen)/10 (1981)
- 2.5 Brautechnische Analysenmethoden, Band III, S. 593-596 (1982), Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising
- 2.6 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Stärke in Fleischerzeugnissen, 07.00-25 (Mai 1983); Bestimmung von Stärke in Wurstwaren, 08.00-26 (Mai 1983); Bestimmung von Stärke in teildaptierter Säuglingsnahrung auf Milchbasis, 48.01-5 (Mai 1985); Bestimmung von Stärke in Kinder-Zwieback und Zwiebackmehl, 48.02.07-3 (Mai 1985); Bestimmung von Stärke in geriebenem Käse, 03.00-39 (September 2010)
- 2.7 Deutsche Norm DIN 54604 (Jan. 1988) Prüfung von Papier und Papp, Bestimmung des Gehaltes an Stärke
- 2.8 Niederlande: Warenwet, Uitvoeringsvoorschriften (C II-6) Regeling Onderzoekingsmethoden voor brood; Methode 15: De Bepaling van Zetmeel (Oktober 1986); Dit voorschrift beschrijft een methode voor de bepaling van zetmeel in de gedroogde kruim van gluten- of alcuronaat brood
- 2.9 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.)
- 3.1 Menger, A. (1974) Anwendung enzymatischer Sorbit-, Zucker- und Stärkebestimmungsmethoden zur Lösung analytischer Probleme bei Brot und Backwaren, *Getreide Mehl Brot* **28**, 36-38
- 3.2 Meuser, F. (1972) Beckman-Report 1/72
- 3.3 Meuser, F. & Rajani, Ch. (1976) Stärkebestimmung in Futtermitteln, *Getreide Mehl Brot* **30**, 173-177
- 3.4 Ettel, W. (1980) Enzymatische Stärkebestimmung, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **71**, 45
- 3.5 Ettel, W. (1981) Eine neue enzymatische Stärkebestimmung für Lebensmittel, *alimenta* **20**, 7-11
- 3.6 Walter, E. (1984) Ringversuche zur enzymatischen Stärkebestimmung, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **179**, 210-217
- 3.7 Bandion, F., Wurzing, A. & Neumann, K. (1986) Zum Nachweis bestimmter Stärke-derivate in Wein, *Mitt. Klosterneuburg* **36**, 207-209
- 3.8 Lukaszewska, A. & Gorin, N. (1988) Simplification of the Boehringer Mannheim Enzymic Analysis of Starch in the Methanol-Insoluble Residue of Freeze-dried Corollas from Cut "Sonia" Roses, *Gartenbauwissenschaft* **53**, 49-51

## 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	Maltose/Saccharose/ D-Glucose	Best. Nr. 11 113 950 035
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	D-Sorbit/Xylit	Best. Nr. 10 670 057 035



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

