

# Saccharose/D-Glucose/ D-Fructose

## UV-Test

zur Bestimmung von Saccharose, D-Glucose und D-Fructose in Lebensmitteln und anderen Probematerialien

**Best. Nr. 10 716 260 035**

Test-Combination für je 22 Bestimmungen

**BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM**  
Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik

Nur zur Verwendung in der Lebensmittelhygiene.

**Lagern bei 2-8°C**

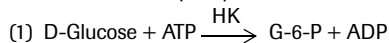
Methoden-Empfehlungen und standardisierte Verfahren  
siehe unter Literatur (A 2, B 2, C 2, D 2)

### Prinzip (Lit. A 1)

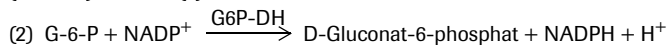
Es wird der D-Glucose-Gehalt vor und nach enzymatischer Hydrolyse der Saccharose bestimmt; D-Fructose wird im Anschluss an die D-Glucose-Bestimmung gemessen.

#### D-Glucose-Bestimmung vor Inversion:

Das Enzym Hexokinase (HK) katalysiert bei pH 7,6 die Phosphorylierung von D-Glucose mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP) unter gleichzeitiger Bildung von Adenosin-5'-diphosphat (ADP) (1).



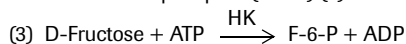
Das entstehende D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) wird von Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP) in Gegenwart von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) spezifisch zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert, wobei reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) entsteht (2).



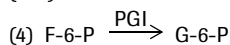
Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der D-Glucose-Menge äquivalent und wird aufgrund ihrer Absorption bei 334, 340 oder 365 nm bestimmt.

#### D-Fructosebestimmung:

Hexokinase katalysiert auch die Phosphorylierung von D-Fructose mit ATP zu D-Fructose-6-phosphat (F-6-P) (3).



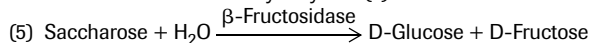
Nach Ablauf der Reaktion (3) wird F-6-P durch Phosphoglucose-Isomerase (PGI) in G-6-P überführt (4).



G-6-P reagiert wiederum mit NADP unter Bildung von D-Gluconat-6-phosphat und NADPH (2). Auch hier ist NADPH Messgröße. Die nun gebildete NADPH-Menge ist der D-Fructose-Menge äquivalent.

#### Enzymatische Inversion:

Saccharose wird durch das Enzym  $\beta$ -Fructosidase (Invertase) bei pH 4,6 zu D-Glucose und D-Fructose hydrolysiert (5).



Die D-Glucose-Bestimmung nach Inversion (Gesamt-D-Glucose) erfolgt nach dem o. g. Prinzip.

Aus der Differenz der D-Glucose-Konzentrationen vor und nach enzymatischer Inversion wird der Gehalt an Saccharose berechnet.

### Die Test-Combination enthält

- Flasche 1 mit ca. 0,5 g Lyophilisat, zusammengesetzt aus: Citratpuffer, pH ca. 4,6;  $\beta$ -Fructosidase, ca. 720 U
- Flasche 2 mit ca. 72 g Pulvergemisch, zusammengesetzt aus: Triethanolamin-Puffer, pH ca. 7,6; NADP, ca. 110 mg; ATP, ca. 260 mg; Magnesiumsulfat
- Flasche 3 mit ca. 1,1 ml Suspension, zusammengesetzt aus: Hexokinase, ca. 320 U; Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, ca. 160 U
- Flasche 4 mit ca. 0,6 ml Suspension Phosphoglucose-Isomerase, ca. 420 U
- Flasche 5 mit Saccharose-Testkontroll-Substanz zur Testkontrolle (Die Messung der Testkontroll-Substanz ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen.) Verwendbar bis: s. Packungsetikett
- Flasche 6 mit D-Glucose-Testkontroll-Lösung zur Testkontrolle (Die Messung der Testkontroll-Lösung ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen.) Die Testkontroll-Lösung enthält keine Saccharose und D-Fructose, da diese in wässriger Lösung nicht ausreichend stabil sind. Testkontroll-Lösung unverdünnt verwenden. (Verwendbar bis: s. Packungsetikett).

### Herstellung der Lösungen

- Inhalt der Flasche 1 mit 10 ml bidest. Wasser lösen.
- Inhalt der Flasche 2 mit 45 ml bidest. Wasser lösen.
- Inhalt der Flasche 3 unverdünnt verwenden.
- Inhalt der Flasche 4 unverdünnt verwenden.

### Stabilität der Reagenzien

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

### Bestimmungsansatz

Wellenlänge<sup>1</sup>: 340 nm, Hg 365 nm oder Hg 334 nm

Glasküvette<sup>2</sup>: 1,00 cm Schichtdicke

Temperatur: 20-25°C

Testvolumen: 3,020 ml (3,040 ml bei Bestimmung der D-Fructose)

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

Probelösung: 4-150  $\mu$ g Saccharose + D-Glucose + D-Fructose/Testansatz<sup>3</sup>  
(in 0,100-1,800 bzw. 2,000 ml Probevolumen)

In Küvetten pipettieren	Leerwert Saccharose- Probe	Saccharose- Probe	Leerwert D-Glucose/ D-Fructose- Probe	D-Glucose/ D-Fructose- Probe
Lösung 1* Probelösung**	0,200 ml -	0,200 ml 0,100 ml	- -	- 0,100 ml
mischen*, mindestens 15 min bei 20-25°C bzw. mindestens 5 min bei 37°C (Lösung 1 vor Pipettieren auf 37°C bringen) stehen lassen. Zugabe von				
Lösung 2 bidest.Wasser	1,000 ml 1,800 ml	1,000 ml 1,700 ml	1,000 ml 2,000 ml	1,000 ml 1,900 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	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, Extink- tionen weiter in 2 min-Abständen messen, bis konstante Extinktionszunahme pro 2 min erreicht ist. Zugabe von				
Suspension 4	-	-	0,020 ml	0,020 ml
mischen***, nach 10-15 min Extinktionen der Lösungen messen (E <sub>3</sub> ).				

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

\*\* Vor der Dosierung der Probelösung Enzymtest-Messpipette bzw. Pipettenspitze der  
Kolbenhüppipette 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 konstante Extinktionszunahmen bei E<sub>2</sub> festgestellt, so werden die  
Extinktionen E<sub>2</sub> auf die Zeit der Zugabe von Suspension 3 (HK/G6P-DH)  
extrapoliert.

Für Leerwerte und Proben Extinktionsdifferenzen (E<sub>2</sub>-E<sub>1</sub>) berechnen.  
Extinktionsdifferenzen der Leerwerte von Extinktionsdifferenzen der  
zugehörigen Proben abziehen:

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

Die Differenz von  $\Delta E_{\text{Gesamt-D-Glucose}}$  (aus Saccharose-Probe) und  
 $\Delta E_{\text{D-Glucose}}$  (aus D-Glucose-Probe) ergibt  $\Delta E_{\text{Saccharose}}$ .

#### Zur D-Fructose-Bestimmung:

Für Leerwert und Probe (D-Glucose/D-Fructose-Probe) Extinktions-  
differenzen (E<sub>3</sub>-E<sub>2</sub>) berechnen. Extinktionsdifferenz des Leerwertes von  
Extinktionsdifferenz der Probe abziehen. Man erhält  $\Delta E_{\text{D-Fructose}}$ .

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

- Das Absorptionsmaximum von NADPH liegt bei 340 nm. Bei Verwendung von Spektral-  
photometern wird im Absorptionsmaximum, bei Verwendung von Spektral-Linienphoto-  
metern mit Hg-Dampflampe bei einer Messstrahlung von 365 nm 334 nm gemessen.
- Anstelle von Glasküvetten sind auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.
- S. Hinweise zur Testdurchführung

## 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]

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient von NADPH bei:

$$340 \text{ nm} = 6,3 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

$$\text{Hg } 365 \text{ nm} = 3,5 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

$$\text{Hg } 334 \text{ nm} = 6,18 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

Hieraus ergibt sich für Saccharose:

$$c = \frac{3,020 \times 342,3}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E_{\text{Saccharose}} = \frac{10,34}{\epsilon} \times \Delta E_{\text{Saccharose}} \text{ [g Saccharose/l Probelösung]}$$

für D-Glucose:

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

für D-Fructose:

$$c = \frac{3,040 \times 180,16}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E_{\text{D-Fructose}} = \frac{5,477}{\epsilon} \times \Delta E_{\text{Fructose}} \text{ [g D-Fructose/l Probelösung]}$$

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 Analysenergebnis auf die Einwaage bezogen:

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

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

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

## 1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Menge an Saccharose + D-Glucose + D-Fructose zwischen 8 µg und 150 µg (Messung bei 365 nm) bzw. 4 µg und 80 µg (Messung bei 340, 334 nm) betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit zu verdünnen, dass die Saccharose- + D-Glucose- + D-Fructose-Konzentration zwischen 0,10 und 1,5 g/l bzw. 0,05 und 0,8 g/l liegt.

### Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge Saccharose + D-Glucose + D-Fructose im Liter Messung bei		Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor F
340 oder 334 nm	365 nm		
< 0,8 g	< 1,5 g	-	1
0,8-8,0 g	1,5-15,0 g	1 + 9	10
8,0-80 g	15,0-150 g	1 + 99	100
> 80 g	> 150 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 2,000 ml zu erhöhen (D-Glucose- und D-Fructose-Probe), bzw. bis auf 1,800 ml zu erhöhen (Saccharose-Probe). 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 die Berechnungsformel entsprechend einzusetzen.

Ist die geschätzte Saccharose-Konzentration geringer als 0,2 g/l, so kann die im Testschema angegebene Inkubationszeit für die Einwirkung von  $\beta$ -Fructosidase auf Saccharose von 15 min auf 5 min herabgesetzt werden.

## 2. Technische Hinweise

Ist das Verhältnis D-Glucose:Saccharose (D-Glucose:D-Fructose) grösser als z.B. 10:1, muss zur präzisen Messung der Saccharose (D-Fructose) vor der Bestimmung der Überschuss an D-Glucose mit GOD/Katalase weitgehend zerstört werden, ansonsten ist die Präzision der Messung von Saccharose und D-Fructose beeinträchtigt. Man verfährt, wie am Beispiel "Honig" unter Pkt. 11. ausgeführt.

## 3. Spezifität der Bestimmung

$\beta$ -Fructosidase spaltet die  $\beta$ -fructosidische Bindung in Saccharose und anderen Glycosiden. Enthält die Probe nur Saccharose, so wird diese spezifisch über D-Glucose gemessen. Auch in Anwesenheit von Fructosanen kann Saccharose spezifisch gemessen werden, wenn nach enzymatischer Hydrolyse mit  $\beta$ -Fructosidase D-Glucose und D-Fructose bestimmt werden und das Verhältnis dieser Monosaccharide 1:1 beträgt. Überwiegt der D-Fructose-Anteil, so sind 2  $\beta$ -Fructosane in der Probe enthalten.

Die Bestimmung der D-Glucose und der D-Fructose ist spezifisch.

Bei der Analyse der Reinsubstanz Saccharose sind Ergebnisse von 100% zu erwarten; bei der Analyse der Reinsubstanzen D-Glucose, wasserfrei (Molmasse 180,16), D-Glucose-monohydrat (Molmasse 198,17) und D-Fructose sind Ergebnisse von unter 100% zu erwarten, da die Substanzen feuchtigkeitsempfindlich sind. (Gelegentlich können D-Glucose-Präparate auch D-Fructose enthalten.)

## 4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt bei der Bestimmung von D-Glucose bzw. D-Fructose 0,005 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen v = 2,000 ml und Messung bei 340 nm einer D-Glucose bzw. D-Fructose-Konzentration von 0,2 mg/l Probelösung (bei v = 0,100 ml entsprechend 4 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von 0,4 mg D-Glucose bzw. D-Fructose/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von jeweils 0,010 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probevolumen v = 2,000 ml.

Bei der Bestimmung der Saccharose (bei Anwesenheit von D-Glucose in der Probe) beträgt die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, 0,010 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen v = 1,800 ml und Messung bei 340 nm einer Saccharose-Konzentration von 1 mg/l Probelösung (bei v = 0,100 ml entsprechend 15 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von 2 mg Saccharose/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,020 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probevolumen v = 1,800 ml.

## 5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von 4 µg Saccharose + D-Glucose + D-Fructose/Ansatz (2 mg Saccharose + D-Glucose + D-Fructose/l Probelösung; Probevolumen v = 1,800 ml) bis 150 µg Saccharose + D-Glucose + D-Fructose/Ansatz (1,5 g Saccharose + D-Glucose + D-Fructose/l Probelösung; Probevolumen v = 0,100 ml).

## 6. Präzision

Bei einer Doppelbestimmung von D-Glucose bzw. D-Fructose, 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 und Messung bei 340 nm einer Konzentration von ca. 4-8 mg D-Glucose bzw. D-Fructose/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. 0,04-0,08 g/100 g.) Bei einer Doppelbestimmung von Saccharose, ausgehend von einer Probelösung, ist (bei Anwesenheit von D-Glucose in der Probe) 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 Saccharose-Konzentration von ca. 15-25 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 erwartenden Unterschiede ca. 0,15-0,25 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten veröffentlicht:

*Flüssigvollei:*

D-Glucose:

$$x = 0,44 \text{ g/100 g} \quad r = 0,073 \text{ g/100 g} \quad s_{(r)} = \pm 0,026 \text{ g/100 g} \\ R = 0,106 \text{ g/100 g} \quad s_{(R)} = \pm 0,037 \text{ g/100 g}$$

D-Fructose:

$$x = 6,72 \text{ g/100 g} \quad r = 0,587 \text{ g/100 g} \quad s_{(r)} = \pm 0,207 \text{ g/100 g} \\ R = 0,748 \text{ g/100 g} \quad s_{(R)} = \pm 0,264 \text{ g/100 g}$$

Saccharose:

$$x = 43,32 \text{ g/100 g} \quad r = 1,722 \text{ g/100 g} \quad s_{(r)} = \pm 1,033 \text{ g/100 g} \\ R = 4,268 \text{ g/100 g} \quad s_{(R)} = \pm 1,501 \text{ g/100 g} \quad (\text{Lit. A 2.4})$$

Weitere Daten: s. Literatur

*Fruchtsaft:*

$$\text{Saccharose: } r = 1,9 + 0,033 \times (c_{\text{Saccharose}} \text{ in g/l}) \text{ g/l} \\ R = 3,3 + 0,061 \times (c_{\text{Saccharose}} \text{ in g/l}) \text{ g/l} \quad (\text{Lit. B 2.6})$$

$$\text{D-Glucose: } r = 0,42 + 0,027 \times (c_{\text{D-Glucose}} \text{ in g/l}) \text{ g/l} \\ R = 1,0 + 0,042 \times (c_{\text{D-Glucose}} \text{ in g/l}) \text{ g/l}$$

$$\text{D-Fructose: } r = 0,15 + 0,033 \times (c_{\text{D-Fructose}} \text{ in g/l}) \text{ g/l} \\ R = 1,05 + 0,045 \times (c_{\text{D-Fructose}} \text{ in g/l}) \text{ g/l} \quad (\text{Lit. C 2.9})$$

*Wein:*

$$r = 0,056 \times x_i \\ R = 0,12 + 0,076 \times x_i \\ x_i = \text{D-Glucose- bzw. D-Fructose-Gehalt in g/l} \quad (\text{Lit. C 2.17, 2.18})$$

## 7. Erkennen von Störungen

- 7.1 Ist die Umsetzung von D-Glucose bzw. von D-Fructose nach der unter "Bestimmungsansatz" angegebenen Zeit beendet, so kann im allgemeinen auf einen störungsfreien Ablauf geschlossen werden.
- 7.2 Nach Ablauf der Reaktion kann durch Zugabe von D-Glucose bzw. D-Fructose (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 Saccharose ist nicht möglich, da nach Änderung der Reaktionsbedingungen von pH 4,6 auf pH 7,6 ("Umpufferung") Saccharose nicht mehr gespalten wird.*
- 7.3 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 Einwäge gegeben sein.
- Die Verwendung von "einfachen" und "doppelten" Probevolumina bei der Doppelbestimmung ist die einfachste Möglichkeit der Testkontrolle bei der Messung von Saccharose.*
- 7.4 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.
- 7.5 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.

## 8. Gefährlichkeit der Reagenzien

Die Reagenzien zur Bestimmung von Saccharose, D-Glucose und D-Fructose 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.

## 9. Allgemeine Hinweise zur Vorbereitung der Proben

**Flüssige, klare, farblose und annähernd neutrale Proben** direkt, nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle oder mit einem Probevolumen bis 2,000 ml (D-Glucose, D-Fructose) bzw. 1,800 ml (Saccharose) zum Test einsetzen;

**trübe Lösungen** filtrieren;

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

**saure Proben** mit Kalilauge oder Natronlauge auf ca. pH 8 einstellen (Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose);

**saure und schwach gefärbte Proben** mit Kalilauge oder Natronlauge auf ca. pH 8 einstellen und ca. 15 min stehen lassen (Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose);

**"stärker gefärbte" Proben** (falls erforderlich auf ca. pH 8 eingestellt) gegen Probeleerwert (= Puffer bzw. bidest. Wasser + Probe) messen (Photometer mit Probeleerwert im Strahlengang auf 0,000 einstellen);

**stark gefärbte Proben** mit Polyamid oder Polyvinylpyrrolidon (PVPP, z.B. 1 g/100 ml Probe) behandeln;

**feste und halbfeste Proben** zerkleinern oder homogenisieren, mit Wasser extrahieren bzw. lösen, wenn nötig filtrieren; ggf. Trübstoffe und Farbstoffe mit Carrez-Reagenzien (s.u.) entfernen;

**Protein-haltige Proben** mit Carrez-Reagenzien (s.u.) klären;

**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 und filtrieren; alternativ nach Extraktion mit heissem Wasser mit Carrez-Reagenzien klären.

### Carrez-Klärung:

Geeignete Problemmenge in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen und ca. 60 ml bidest. Wasser hinzufügen bzw. 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 =  $3,60 \text{ g K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3 \text{ H}_2\text{O}/100 \text{ ml}$ ) und 5 ml Carrez-II-Lösung (Zinksulfat, 250 mM =  $720 \text{ g ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}/100 \text{ ml}$ ) 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.

**Die Enteiweissung Protein-haltiger Proben mit Perchlorsäure oder Trichloressigsäure darf in Anwesenheit von Saccharose und Maltose in der Probe nicht durchgeführt werden, da diese Disaccharide vollständig oder teilweise unter Freisetzung von D-Glucose hydrolysiert werden. Es wird die Carrez-Klärung empfohlen.**

## 10. Anwendungsbeispiele

### Bestimmung von Saccharose, D-Glucose und D-Fructose in Fruchtsäften und ähnlichen Getränken

Trübe Säfte filtrieren (alternativ mit Carrez-Reagenzien klären) und soweit verdünnen, dass die Saccharose- + D-Glucose- + D-Fructose-Konzentration etwa 0,1 bis 1,5 g/l beträgt. Die verdünnte Probelösung kann zum Test eingesetzt werden, auch wenn diese gefärbt ist. Nur stark gefärbte Säfte müssen vorher entfärbt werden, wenn sie aufgrund ihrer geringen Saccharose- + D-Glucose- + D-Fructose-Konzentration unverdünnt zum Test eingesetzt werden. In diesem Fall verfährt man wie folgt:

10 ml Saft und 0,1 g Polyamidpulver oder Polyvinylpyrrolidon mischen, 1 min rühren und filtrieren. Klare, leicht gefärbte Lösung zum Test einsetzen.

### Bestimmung von Saccharose, D-Glucose und D-Fructose in Bier

Etwa 5–10 ml Bier durch Faltenfilter filtrieren oder im Becherglas ca. 30s mit einem Glasstab zur Entfernung der Kohlensäure rühren. Die weitgehend CO<sub>2</sub>-freie Probe kann unverdünnt zum Test eingesetzt werden.

### Bestimmung von Saccharose, D-Glucose und D-Fructose in gezuckerter Kondensmilch

Ca. 1 g Probe in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, 60 ml Wasser hinzufügen und 15 min bei ca. 60°C halten. Kolben gelegentlich umschwenken. Zur Klärung 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g Kaliumhexacyanoferrat(II),  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3 \text{ H}_2\text{O}/100 \text{ ml}$ ), 5 ml Carrez-II-Lösung (720 g Zinksulfat,  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}/100 \text{ ml}$ ) und 10 ml NaOH (0,1 M) hinzufügen, nach jeder Zugabe mischen, auf 20–25°C bringen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren. Klare, evtl. leicht opaleszente Lösung zum Test einsetzen, ggf. entsprechend Verdünnungstabelle vorher verdünnen.

### Bestimmung von Saccharose, D-Glucose und D-Fructose in Konfitüre und Speiseeis

Etwa 10 g Probe im Mixer homogenisieren. Ca. 0,5 g der homogenisierten Probe in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, mit Wasser mischen, bis zur Marke auffüllen und filtrieren. Die ersten 5 ml des Filtrats verwerfen. Klares Filtrat, ggf. gemäss Verdünnungstabelle verdünnt, zum Test einsetzen.

### Bestimmung von Saccharose, D-Glucose und D-Fructose in Kartoffeln

50 g geschälte Kartoffeln mit 50 ml Wasser in einem Homogenisator 3 min homogenisieren. Inhalt quantitativ in ein 250 ml-Becherglas geben. Mit Wasser auf ca. 150 ml auffüllen. Nacheinander 5 ml Carrez-I-Lösung (Herstellung s. Pkt. 9.) und 5 ml Carrez-II-Lösung (Herstellung s. Pkt. 9.) hinzufügen, nach jeder Zugabe kräftig schütteln. Mit Natronlauge (0,1 M) auf einen pH-Wert von 7,0 bis 7,5 einstellen (pH-Meter). Inhalt des Becherglases quantitativ in einen 250 ml - Messkolben giessen, mit Wasser nachspülen, 0,3 ml n-Octanol hinzufügen und so lange schütteln, bis der Schaum verschwunden ist. Mit Wasser auf 250 ml auffüllen, mischen und filtrieren. Leicht gelbe, gelegentlich gelb-grüne Lösung mit  $v = 0,100 \text{ ml}$  - ggf. 0,200 ml - sofort zum Test einsetzen.

### Bestimmung von Saccharose, D-Glucose und D-Fructose in Tabak (Lit. A 3.7)

Ca. 0,3 g getrocknete, fein gemahlene und gesiebte Tabakblätter (Korngrösse ca. 0,2 mm) in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, etwa 70 ml Wasser hinzufügen und etwa 1 Stunde rühren (Magnetrührer). Mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren.

10 ml des Filtrats in einem 25 ml-Messkolben nacheinander mit 1,25 ml Carrez-I-Lösung und 1,25 ml Carrez-II-Lösung (Herstellung: s. Pkt. 9.) versetzen und mischen, anschliessend 2,5 ml Natronlauge (0,1 mol/l) hinzufügen und mischen. Mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren.

Klare Lösung, ggf. verdünnen, zum Test einsetzen.

## 11. Besondere Vorbereitung der Probe zur Saccharose- und D-Fructose-Bestimmung bei hohem D-Glucose-Überschuss

**Bestimmung von Saccharose, D-Glucose und D-Fructose in Honig** Honig mit einem Spatel gut umrühren. Von dickflüssigem (oder kristallisiertem) Honig etwa 10 g entnehmen, im Becherglas 15 min bei ca. 60°C erhitzen und gelegentlich mit Spatel rühren (dünnflüssiger Honig braucht nicht erhitzt zu werden). Honig abkühlen lassen. Etwa 1 g der dünnflüssigen Probe in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen. Mit zunächst wenig Wasser lösen, dann bis zur Marke auffüllen. Lösung zum Test einsetzen.

### a) D-Glucose- und D-Fructose-Bestimmung

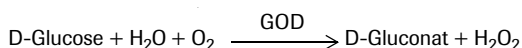
Die 1%ige Honiglösung im Verhältnis 1:10 (1 + 9) verdünnen und zum Test einsetzen.

### b) Saccharose-Bestimmung

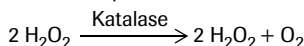
Liegt der zu erwartende Gehalt an Saccharose im Honig zwischen 5 und 10%, so wird die 1%ige Lösung im Verhältnis 1:3 (1 + 2) verdünnt und zum Test eingesetzt.

Liegt der zu erwartende Gehalt an Saccharose im Honig zwischen 0,5 und 5%, so ist vor der Bestimmung der Saccharose eine weitgehende Zerstörung der im Überschuss vorliegenden D-Glucose notwendig, ansonsten ist die Präzision der Messung von Saccharose beeinträchtigt. In Gegenwart von Glucose-Oxidase (GOD) und Luft-Sauerstoff 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  $\beta$ -Fructosidase je < 0,01 %

Katalase

Triethanolamin-hydrochlorid

$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

$\text{NaOH}$ , 4 M

#### Herstellung der Lösungen für 10 Bestimmungen

Enzymlösung:

5 mg ( $\Delta$  ca. 1000 U) GOD mit 0,750 ml bidest. Wasser lösen, 325 KU Katalase (aus Rinderleber; 25°C,  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Substrat) zugeben, mischen.

Pufferlösung:

5,6 g Triethanolamin-hydrochlorid und 0,1 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  80 ml bidest. Wasser lösen, mit Natronlauge (4 M) auf pH 7,6 einstellen und mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen.

Stabilität der Lösungen

Die Enzymlösung ist täglich 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. 0,5% D-Glucose)	5,000 ml
Enzymlösung	0,100 ml
1 Stunde lang Luft ( $\text{O}_2$ ) durch die Mischung leiten, während der Oxidation pH-Wert mit Indikatorpapier überprüfen und ggf. mit NaOH die gebildete Säure neutralisieren.	

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. 0,500 ml der klaren Lösung zur Saccharose-Bestimmung einsetzen. Im Parallel-Ansatz Rest-D-Glucose bestimmen und wie üblich bei der Berechnung berücksichtigen.

#### 12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch anwendbar bei der Untersuchung von Pharmaka, Papier (Lit. B 2.2) und bei der Analytik biologischer Proben.

#### Bestimmung von Saccharose, D-Glucose und D-Fructose 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. (Alternativ kann auch eine Enteiweissung mittels Carrez-Lösungen erfolgen. Siehe die oben beschriebenen Anwendungsbeispiele.)

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

# D-Glucose-Testkontroll-Lösung (Flasche 6)

**Konzentration\*:** siehe Flaschenetikett

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

#### Anwendung:

1. *Zusatz der D-Glucose-Testkontroll-Lösung zum Testansatz D-Glucose/D-Fructose-Probe:*

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

2. *„Quantitativer Nachstart“:*

Nach Ablauf der Reaktion mit Probelösung und Messung von  $E_3$  werden 0,050 ml der Testkontroll-Lösung zum Probeansatz gegeben. Nach Ablauf der Reaktion (ca. 15 min) wird die Extinktion  $E_4$  gemessen. Aus der Differenz ( $E_4 - E_3$ ) wird nach der allgemeinen Berechnungsformel die Konzentration von D-Glucose 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 von D-Glucose (keine groben Fehler bei Testansatz; Probe ist frei von Hemmsubstanzen) kann die Standard-Lösung als interner Standard verwendet werden.

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

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

*Hinweis:*

Eine wässrige Lösung von Saccharose und D-Fructose ist nicht ausreichend stabil. Deshalb ist eine Testkontroll-Lösung in der Test-Combination nicht enthalten.

\* Als wasserfreie D-Glucose angegeben.

#### A. Literatur zur Bestimmung von Saccharose, D-Glucose und D-Fructose

- A 2.1 Fuchs, G. & Wretling S. (1979) Bestämning av fruktos, glukos och sackaros i livsmedel, Vår Föda **31**, 435-439
- A 2.2 Bundesverband der Deutschen Feinkostindustrie e.V. Bonn; Analysenmethoden: Bestimmung des Zuckergehaltes in Tomatenmark (enzymatisch), IV/61 (Dezember 1979)
- A 2.3 Norme Française Homologuée NF V 76-106 (Octobre 1980) Jus Fruits et Jus de Légumes: Détermination de la Teneur en Saccharose, D-Glucose, D-Fructose (Méthode enzymatique)
- A 2.4 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung des Zuckergehalts in Tomatenmark (enzymatische Methode), 26.11.03-8 (Mai 1983); Bestimmung des Zuckergehalts in Tomatenketchup und vergleichbaren Erzeugnissen (enzymatische Methode), 52.01.01-8 (November 1983); Bestimmung von Saccharose, Glucose und Fructose in teildaptierter Säuglingsnahrung auf Milchbasis, 48.01-3 (Mai 1985); Bestimmung des Gesamtzuckergehaltes in Speiseisen, 52.06-5 (Dezember 1991); Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose in Eiern und Eiprodukten, 05.00-10 (Dezember 2003)
- A 2.5 Office International du Cacao, du Chocolat et de la Confiserie, IOCCC Method number 113-1989: Determination of Glucose, Fructose and Sucrose in Chocolate and Sugar Confectionery Products by Means of Enzymes, Draft Standard Method, 1 st Edition
- A 2.6 Österreichisches Lebensmittelbuch (Codex Alimentarius Austriacus), Kapitel B29: Senf; Erlass vom 27. Oktober 1989 (s. ERNÄHRUNG/NUTRITION **14**, 168-170 (1990))
- A 3.1 Drawert, F. (1964) Enzymatische Analyse von Glucose, Fructose, Saccharose und Sorbit in Weinen und Traubenmosten, VITIS **4**, 185-187
- A 3.2 Trautner, K. (1969) Enzymatische Zuckerbestimmungen, Zeitschrift für Ernährungswissenschaft, Suppl. **8**, S. 40-45

- A 3.3 Somogyi, J.C. & Trautner, K. (1974) Der Glucose-, Fructose- und Saccharosegehalt verschiedener Gemüsearten, Schweiz.Med.Wochenschrift **104**, 177-182
- A 3.4 Trautner, K. & Somogyi, J.C. (1979) Zuckergehalte von Obst und Gemüse - Einflüsse von Reifegrad, Sorte und Lagerung, Mitt Gebiete Lebensm.Hyg. **70**, 497-508
- A 3.5 Zürcher, K. & Hadorn, H. (1976) Veränderungen des Zuckerspektrums eines Sirups während der Lagerung, Mitt Gebiete Lebensm.Hyg. **67**, 136-139
- A 3.6 Zürcher, K. & Hadorn, H. (1976) Vergleichende Zuckerbestimmungen mit gaschromatographischen, enzymatischen und reduktometrischen Methoden, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **72**, 197-202
- A 3.7 Sekin, S. (1978) Enzymatic Determination of Glucose, Fructose and Sucrose in Tobacco, Tobacco Sci. **23**, 75-77; Tobacco International **181**, 27-29
- A 3.8 Polascsek-Rácz, M., Pauli, M. P., Horváth, G. & Vámos-Vigyázó (1981) Enzymatic determination of the sugars in red pepper, Z. Lebensm. Unters. Forsch. **172**, 115-117

#### B. Literatur zur Bestimmung von Saccharose und D-Glucose

- B 1.1 Bergmeyer, H. U. & Bernt, E. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse Bergmeyer, H.U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2. S. 1221-1224; Verlag Chemie, Weinheim, und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 3, p. 1176-1179, Verlag Chemie Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
- B 2.1 Handbuch für diätetische Lebensmittel. Analytik - Reinheitsanforderungen - (1973) des Bundesverbandes der diätetischen Lebensmittelindustrie e.V., Bad Homburg, herausgegeben von der Fördergesellschaft Diätetische Lebensmittel mbH, S. 57-60
- B 2.2 Untersuchung von Papieren, Kartons und Pappen für Lebensmittelverpackungen (gem. Empfehlungen XXXVI der Kunststoffkommission des Bundesgesundheitsamtes) Kapitel 8 (Methoden), Pkt. 3.5.2 (März 1979)
- B 2.3 Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 61B (Enzymatische Bestimmungen)/1.3 (1981), Kap.2A (Milchmischgetränke)/10 (1980), Kap. 2B (Sauermilchprodukte)/10 (1980), Kapitel 4 (Milchdauerwaren)/5.2 (1993), Kap. 9 (Speiseeis)/4.3 (1983), Kap. 22

- (Diätetische Lebensmittel und Speziallebensmittel)/6.3 (1991), Kap. 28A (Frucht- und Gemüsesäfte u.a.)/5.4 (1988), Kapitel 30A (Wein aus Trauben)/4.4 (1993), Kapitel 36A (Kakao, Kakaoomasse, Kakaopulver und Schokoladenpulver)/7.2 (1992)
- B 2.4 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau **77**, 3 (Glucose), 11 (Saccharose)
- B 2.5 Brautechnische Analysenmethoden, Band III, S. 586-589 (1982), Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising
- B 2.6 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64, LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Saccharose in Fleischerzeugnissen, 07.00-24 (Mai 1983); Bestimmung von Saccharose in Wurstwaren, 08.00-25 (Mai 1983); Bestimmung des Gehaltes an Saccharose und Glucose in Milchprodukten und Speiseeis; Enzymatisches Verfahren, 02.00-12 (Juni 2009); Bestimmung des Gehaltes an Saccharose und Glucose in Käse; Enzymatisches Verfahren, 03.00-12 (Mai 1986); Bestimmung des Gehaltes an Saccharose und Glucose in Speiseeis; Enzymatisches Verfahren, 42.00-5 (Juni 2009); Enzymatische Bestimmung des Saccharosegehaltes in Frucht- und Gemüsesäften, 31.00-13 (September 1997); Enzymatische Bestimmung des Saccharosegehaltes in Gemüsesäften, 26.26-17 (September 1997)
- B 2.7 Deutsche Norm DIN 10326 (Februar 1986) Bestimmung des Gehaltes an Saccharose und Glucose in Milchprodukten und Speiseeis; Enzymatisches Verfahren
- B 2.8 Methodensammlung der Internationalen Fruchtsaft-Union (IFU-Analysen-Methode Nr. 56-1985); 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.)
- B 2.9 Niederlande: Warenwet, Uitvoeringsvoorschriften (CII-6), Regeling Onderzoekingsmethoden voor brood; Methode 14: De Bepaling van het Suikergehalte als de Som van Saccharose en Invertsuiker, de laatste herleidt tot Saccharose (Oktober 1986); Dit voorschrift betreft een methode voor de enzymatische bepaling van de som van saccharose en invertsuiker, de laatste berekend als saccharose, in brood
- B 2.10 Österreichisches Lebensmittelbuch (Codex Alimentarius Austriacus), Kapitel B8 (Essig), Erlass vom 16. Juni 1986 (s. ERNÄHRUNG/NUTRITION **11**, 49-53 (1987); Kapitel B15 (Kakao, Kakaoverzeugnisse, Lebensmittel mit Kakao oder Schokolade, Nougat, Nougatmassen) (1983)
- B 2.11 RSK-Werte, die Gesamtdarstellung, Richtwerte und Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen für Fruchtsäfte und Nektare einschliesslich überarbeiteter Analysenmethoden (1987), 1. Auflage, Verlag Flüssiges Obst, D-56370 Eschborn, S. 151-154
- B 2.12 Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, VDLUFA (1988) Methodenbuch Band VI: Enzymatische Bestimmung des Glucose- und Saccharosegehaltes von Milchprodukten; C20.3
- B 2.13 Niederlande Norm NEN 2858 (1e druk, oktober 1989) Vruchtesappen: Bepaling van het saccharosegehalte; Enzymatische methode (Fruit juices - Determination of the sucrose content - Enzymatic method)
- B 2.14 Europäische Norm/European Standard EN 12146 (Okt. 1996) Frucht- und Gemüsesäfte - Enzymatische Bestimmung des Saccharosegehaltes - Spektralphotometrische Verfahren mit NADP (Fruit and vegetable juices - Enzymatic determination of sucrose content - NADP spectrophotometric method)
- B 2.15 Deutsche Norm DIN EN 12146 (Okt. 1996) Frucht- und Gemüsesäfte, Teil 4: Enzymatische Bestimmung des Saccharosegehaltes; Spektralphotometrisches Verfahren mit NADP
- B2.16 Niederlande Norm NEN-EN 12146 (Oktober 1996) Vruchten- en groentesappen. Enzymatische Bepaling van het gehalte aan saccharose. NADP-spectrometrische methode
- B2.17 Standard der Russischen Föderation / Standard of the Russian Federation / GOST-STANDART ROSSII GOST R 51258-99 (1999) Milk and milk products. Method for determination of sucrose and glucose content
- C. Literatur zur Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose**
- C 1.1 Schmidt, F.H. (1961) Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander, Klinische Wochenschrift **39**, 1244-1247
- C 1.2 Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F. & Stork, H. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1241-1246; Verlag Chemie, Weinheim und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1196-1201; Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
- C 1.3 Bernt, E. & Bergmeyer, H.U. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1349-1352; Verlag Chemie, Weinheim und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1304-1307; Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
- C 1.4 Kunst, A., Draeger, B. & Ziegenhorn, J. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 163-172, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- C 1.5 Beutler, H.-O. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 321-327, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- C 2.1 Handbuch für diätetische Lebensmittel. Analytik - Reinheitsanforderungen - 1973 des Bundesverbandes der diätetischen Lebensmittelindustrie e.V., Bad Homburg, herausgegeben von der Fördergesellschaft Diätetische Lebensmittel mbH, S. 27-30
- C 2.2 Lafon-Lafourcade, S., Lafitte, M. & Joyeux, A. (1977) Dosage du Glucose et du Fructose Résiduels dans les Vins par Methode Enzymatique, Office International de la Vigne et du Vin, n.600/F.V. 634
- C 2.3 Deutsche Norm (April 1979) Untersuchung von Stärke und Stärkerzeugnissen; Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose in derselben Untersuchungsprobe (Enzymatisches Verfahren), DIN 10381
- C 2.4 Methodenbuch für Weinanalysen in Österreich (1980), herausgegeben von Arbeitsgemeinschaft der Landw. Versuchsanstalten in Österreich (ALVA)
- C 2.5 Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 61B (Enzymatische Bestimmungen)/1.1, 1.2 und 1.6 (1981), Kapitel 2A (Milchmischgetränke)/11 (1980), Kapitel 9 (Speiseeis)/4.3 (1983), Kapitel 22 (Diätetische Lebensmittel und Speziallebensmittel)/6.3 (1991), Kapitel 23A (Honig)/8.2 (1995), Kapitel 28A (Frucht- und Gemüsesäfte u.a.)/5.4 (1988), Kapitel 30A (Wein aus Trauben)/4.4 (1993), Kapitel 34 (Gärungssessig)/8.1 (1994)
- C 2.6 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau **77**, 3 (Glucose) und 9-10 (Fructose)
- C 2.7 Brautechnische Analysenmethoden, Band III, S. 580-586 (1982), Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising
- C 2.8 Österreichisches Lebensmittelbuch (Codex Alimentarius Austriacus), Kapitel B15 (Kakao, Kakaoverzeugnisse, Lebensmittel mit Kakao oder Schokolade, Nougat, Nougatmassen) (1983); Kapitel B22 (Zucker und Zuckerarten) (1983)
- C 2.9 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64, LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Glucose und Fructose in Kinder-Zwieback und Zwiebackmehl, 48.02.07-1 (Mai 1985); Enzymatische Bestimmung der Gehalte an D-Glucose und D-Fructose in Frucht- und Gemüsesäften, 31.00-12 (Januar 1997); Enzymatische Bestimmung der Gehalte an D-Glucose und D-Fructose in Gemüsesäften, 26.26-11 (Januar 1997)
- C 2.10 Henniger, G. & Mascaro, L. (1985) Enzymatic-Ultraviolet Determination of Glucose and Fructose in Wine: Collaborative Study, J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68**, 1021-1024
- C 2.11 Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (1990), 15th ed., vol. 2, pp. 741-742 (1985.09)
- C 2.12 Die Methode ist zugelassen bei der Untersuchung von Wein im Rahmen der Qualitätsprüfung in Rheinland-Pfalz (1985; Landwirtschaftskammer Bad Kreuznach) und in Hessen (1986; Ministerium für Landwirtschaft und Forsten).
- C 2.13 Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste (1986) Approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi per i mosti, i vini, gli agri di vino (aceti) e i sottoprodotti della vinificazione". Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 161 del 14 luglio 1986
- C 2.14 Methodensammlung der Internationalen Fruchtsaft-Union (IFU-Analysen-Methode Nr. 55-1985); 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.)
- C 2.15 RSK-Werte, die Gesamtdarstellung, Richtwerte und Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen für Fruchtsäfte und Nektare einschliesslich überarbeiteter Analysenmethoden (1987), 1. Auflage, Verlag Flüssiges Obst, D-56370 Eschborn, S. 110-114
- C 2.16 Niederlande Norm NEN 2857 (1e druk, oktober 1989) Vruchtesappen: Bepaling van het glucose- en fructosegehalte; Enzymatische methode (Fruit juices - Determination of the glucose and fructose content - Enzymatic method)
- C 2.17 Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, Complément n° 1 à l'édition officielle de juin 1990, OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, S. 97-100
- C 2.18 Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L272 (3. Oktober 1990), Rechtsvorschriften: Verordnung (EWG) Nr. 2676/90 der Kommission vom 17. September 1990 zur Festlegung gemeinsamer Analysenmethoden für den Weinsektor (S. 61-63)
- C 2.19 Deutsche Norm DIN EN 1140 (1994) Frucht- und Gemüsesäfte; Enzymatische Bestimmung der Gehalte an D-Glucose und D-Fructose; Spektralphotometrische Bestimmung von NADPH
- C 2.20 European Standard EN 1140 (Dec. 1994) Fruit and vegetable juices; Enzymatic determination of D-glucose and D-fructose content by the NADPH spectrometric method
- C 2.21 Standard der Russischen Föderation / Standard of the Russian Federation / GOST-STANDART ROSSII GOST R 51240-98 (1998) Fruit and vegetable juices. Determination of D-glucose and D-fructose content
- C 3.1 Weichel, H.H. (1965) Die quantitative Bestimmung von Fructose neben anderen Kohlenhydraten in Lebensmitteln durch enzymatische Analyse, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **61**, 53-55
- C 3.2 Tschersich, J. & Mauch, W. (1968) Enzymatisch-photometrische Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose in Verbraucherzucker, Zeitschrift für die Zuckerindustrie **18**, 107-110
- C 3.3 Baumann, G. & Gierschner, K. (1971) Die Bestimmung von Zuckern in Fruchtsäften - ein Vergleich der enzymatischen mit der Luff-Schoorl-Methode, Ind. Obst- und Gemüseverwertung **56**, 165-170
- C 3.4 Kubadinow, N. (1974) Die enzymatische Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose in Zuckerrüben und Betriebssäften der Zuckerproduktion und Vergleich ihrer Ergebnisse mit den Werten der Berliner Institutsmethode, Zucker **72**-78
- C 3.5 Schiweck, H. & Büsching, L. (1974) Das Verhalten von Glucose und Fructose während der Zuckerfabrikation, Zucker **72**, 122-128
- C 3.6 Schultz, K.W. & Rummel, M. (1975) Beispiel für die Anwendung von Enzymen bei der pharmazeutischen Analyse, Acta Pharmaceutica Technologica **21**, 167-170
- C 3.7 Promayon, J., Barel, M., Fourny, G. & Vincent, J.-C. (1976) Essais de Détermination de la Teneur en Chicorée dans les Mélanges Solubles de Café et de Chicorée, Café Cacao Thé **20**, 209-217
- C 3.8 Motz, R.J. (1976) Enzymatische Zuckerbestimmung, Zucker und Süßwarenwirtschaft **29**, 75-77
- C 3.9 Wagner, K. & Kreutzer, P. (1977) Zusammensetzung und Beurteilung von Auslesen, Beeren- und Trockenbeerenauslesen, Die Weinwirtschaft **10**, 272-275
- C 3.10 Henniger, G. & Boos, H. (1978) Anwendung der enzymatischen Analyse bei der Untersuchung kosmetischer Präparate - dargestellt an einigen Beispielen, Seifen - Öle - Fette - Wachse **104**, 159-164
- C 3.11 Klingbeil, L., Grossklaus, R. & Pahlke, G. (1979) Erfahrungen mit der enzymatischen Bestimmung von Zucker und Zuckeraustauschstoffen in Diabetikerwaren, Z. Lebensm. Unters. Forsch. **169**, 359-360
- C 3.12 Wucherpfennig, K., Otto, K. & Yueh-Chyng Huang (1986) Aussagekraft des Glucose-Fructose-Verhältnisses, Die Weinwirtschaft-Technik **122**, 254-260
- C 3.13 Millies, K. D., Sponholz, W.R. & Eberle, C. (1988) Methoden zur Zuckerbestimmung, Weinwirtschaft - Technik, Heft 6, S. 6-11
- C 3.14 Plessi, M., Monzani, A., & Coppini, D. (1988) Determination of the Monosaccharide and Alcohol Content of Balsamic and Other Vinegars by Enzymatic Methods, Agric. Biol. Chem. **52**, 25-30
- D. Literatur zur Bestimmung von D-Glucose**
- D 2.1 Brautechnische Analysenmethoden, Band II, S. 400-402 (1979), Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising
- D 2.2 Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 61B (Enzymatische Bestimmungen)/1.1 (1981)
- D 2.3 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau **77**, 3 (Glucose)
- D 2.4 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64, LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Glucose in Fleischerzeugnissen, 07.00-22 (Mai 1983); Bestimmung von Glucose in Wurstwaren, 08.00-23 (Mai 1983); Bestimmung der belastenden Kohlenhydrate in Diätbier für Diabetiker (als Gesamtglucose), 49.01.05-1 (Mai 1984)
- D 2.5 Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste (1986) Approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi per i mosti, i vini, gli agri di vino (aceti) e i sottoprodotti della vinificazione". Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 161 del 14 luglio 1986
- D 3.1 Henniger, G. & Schütz, A. (1987) Methods for the Enzymatic Determination of D-Glucose, Poster-Präsentation bei Association of Official Analytical Chemists Annual International Meeting, San Francisco, CA, USA

# Hinweis

## zur Test-Combination Saccharose/D-Glucose/D-Fructose

Diese Packung enthält eine Saccharose-Testkontroll-Substanz (s. Flasche 5). Sie kann zur Herstellung einer Testkontroll-Lösung verwendet werden (Konzentration z.B. 1 g/l), die anstelle der im Pipettierschema angegebenen Probelösung in die Küvette pipettiert wird ( $v = 0,100 \text{ ml}$ ).

Die Testkontroll-Substanz kann ausser zur oben genannten Testkontrolle auch zur Durchführung des "Schweizerischen Saccharose-Tests", der zur Überprüfung der Arbeitstechnik dient, verwendet werden.

### Schweizerischer Saccharose-Test

Es wird eine Testkontroll-Lösung hergestellt und die Konzentration enzymatisch bestimmt. Die Resultate erlauben die Beurteilung von Richtigkeit und Präzision.

### Reagenzien

Lösungen gemäss Arbeitsanleitung der Test-Combination herstellen.

### Probelösung (Testkontroll-Lösung)

1,6 g Saccharose auf 0,1 mg genau einwiegen (= Einwaage), im Messkolben mit bidest. Wasser lösen, auf 1000 ml auffüllen und gründlich mischen.

### Durchführung

Einzelheiten zur Durchführung und Berechnung der Konzentrationen sind der Arbeitsanleitung in der Test-Combination zu entnehmen.

Für Leerwert 2 Ansätze, für Probe 6 Ansätze ausführen.

### Pipettierschema

In Küvetten pipettieren	Leerwerte		Probe					
	1. Ansatz	2. Ansatz	1. Ansatz	2. Ansatz	3. Ansatz	4. Ansatz	5. Ansatz	6. Ansatz
Lösung 1*	0,200ml	0,200ml	0,200ml	0,200ml	0,200ml	0,200ml	0,200ml	0,200ml
Probelösung*	-	-	0,100ml	0,100ml	0,100ml	0,100ml	0,100ml	0,100ml
mischen**, 15 min bei 20-25°C inkubieren. Zugabe von								
Lösung 2	1,000ml	1,000ml	1,000ml	1,000ml	1,000ml	1,000ml	1,000ml	1,000ml
bidest. Wasser	1,800ml	1,800ml	1,700ml	1,700ml	1,700ml	1,700ml	1,700ml	1,700ml
mischen, nach ca. 3 min Extinktionen $E_1$ der Lösungen messen. Reaktion starten durch Zugabe von								
Suspension 3	0,020ml	0,020ml	0,020ml	0,020ml	0,020ml	0,020ml	0,020ml	0,020ml
mischen, 15 min bei 20-25°C stehen lassen und Extinktionen $E_2$ der Lösungen messen								
* Auf den Boden der Küvette pipettieren. ** Durch vorsichtiges Schwenken mischen. Bei Verwendung eines Plastikspatels („Plümper“) diesen erst unmittelbar vor der Extinktionsmessung $E_1$ aus der Küvette nehmen.								
Messwerte								
$E_1$ :								
$E_2$ :								
$E_2 - E_1$ :								
Mittelwert Leerwert - Extinktionsdifferenzen:								
$(E_2 - E_1)_{\text{Probe}}$ $(E_2 - E_1)_{\text{Mittelwert Leerwerte}} = \Delta E$ :								

### Berechnung

Für jeden Bestimmungsansatz Extinktionsdifferenzen ( $E_2 - E_1$ ) berechnen. Von den einzelnen Extinktionsdifferenzen der Proben den Mittelwert der Extinktionsdifferenzen der Leerwerte abziehen. Es resultiert daraus:

$\Delta E_{\text{Ansatz 1}}, \Delta E_{\text{Ansatz 2}}, \dots, \Delta E_{\text{Ansatz 6}}$

Daraus ergibt sich die Konzentration an Saccharose in g/l:

$$c = \frac{V \times MG}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E_{\text{Ansatz 1, 2, \dots, 6}}$$

$$c = \frac{3,020 \times 342,3}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E_{\text{Ansatz 1, 2, \dots, 6}}$$

$$c = \frac{10,34}{\epsilon} \times \Delta E_{\text{Ansatz 1, 2, \dots, 6}}$$

$c_{\text{Saccharose (g/l):}}$

Von den 6 Resultaten  $c_1, c_2, \dots, c_6$  Mittelwert  $\bar{c}$  und Standardabweichung  $s_{\bar{c}}$  berechnen.

Mittelwert  $c_{\text{Saccharose}} (\bar{c})$ :  g/l

Standardabweichung  $s_{\bar{c}}$ :  g/l

Berechnung der mittleren Ausbeute  $\bar{A}$  und deren Standardabweichung  $s_{\bar{A}}$ :

$$\bar{A} = \frac{(\bar{c}) [\text{g/l}] \times 100}{\text{Einwaage} [\text{g/l}]} = \frac{\text{ } \times 100}{\text{ } } = \text{ } \text{ g/100 g}$$

$$s_{\bar{A}} = \frac{s_{\bar{c}} [\text{g/l}] \times 100}{\text{Einwaage} [\text{g/l}]} = \frac{\text{ } \times 100}{\text{ } } = \text{ } \text{ g/100 g}$$

### Bewertung der Standardabweichung

Standardabweichung  $s_{\bar{A}} \leq 0,79 \text{ g/100g}$ :

Die Präzision der Bestimmung ist einwandfrei.

Standardabweichung  $s_{\bar{A}} > 0,79 \text{ g/100 g}$ :

Die Standardabweichung  $s$  ist zu gross. Die Ursache dafür ist entweder bei der Verwendung ungeeigneter Geräte (Photometer, Küvetten, Pipetten) oder bei deren falscher Anwendung zu sehen. Es sind Massnahmen zu ergreifen, um diese Schwierigkeiten zu beseitigen (z.B. Kontrolle von Photometer, Küvetten und Pipetten).

### Bewertung der Ausbeute

Abweichung der mittleren Ausbeute ( $\bar{A}$ ) von der theoretischen Ausbeute ( $\Delta 100 \text{ g/100 g}$ ) =  $\Delta A$

$$\Delta A = |100 - \bar{A}| \leq 0,42 \text{ g/100 g}$$

Die Richtigkeit der Bestimmung ist einwandfrei.

$$\Delta A = |100 - \bar{A}| = 0,43 \text{ bis } 1,42 \text{ g/100 g}$$

Systematische Fehler sind nachgewiesen, die aber aufgrund der Spezifikation der meisten Photometer akzeptiert werden müssen.

$$\Delta A = |100 - \bar{A}| > 1,42 \text{ g/100 g}$$

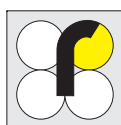
Die Abweichung der mittleren Ausbeute von der theoretischen Ausbeute ist zu gross. Die Ursache ist ebenfalls entweder bei der Verwendung ungeeigneter Geräte (Waage, Photometer, Küvetten, Pipetten) oder bei deren falscher Anwendung zu sehen. Es sind Massnahmen zu ergreifen, um diese Schwierigkeiten zu beseitigen (s.o.).

### Literatur

- Walter, E. (1980) Zur Prüfung der Laborausrüstung für enzymatische Bestimmungen, *alimenta* **19**, 159-164
- Schweizerisches Lebensmittelbuch (1981), 5. Auflage, Kapitel 61: Enzymatische Bestimmungen, Allgemeiner Teil, S. 17-18 (Bearbeitet von Mitgliedern der 26. Subkommission, herausgegeben von der Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale, CH-Bern) 1997

### Ebenfalls verfügbar:

Test-Combination D-Glucose	Best.Nr. 10 716251 035
Test-Combination D-Glucose/D-Fructose	Best.Nr. 10 139106 035
Test-Combination Maltose/Saccharose/ D-Glucose	Best.Nr. 11 113950 035
Test-Combination Saccharose/D-Glucose	Best.Nr. 10 139041 035
Test-Combination Sorbit/Xylit	Best.Nr. 10 670057 035
Test-Combination Stärke	Best.Nr. 10 207748 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

