

Saccharose/D-Glucose

UV-Test

zur Bestimmung von Saccharose und D-Glucose in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien

Best. Nr. 10 139 041 035

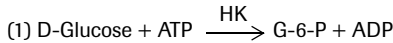
Test-Combination für je 22 Bestimmungen

Prinzip (Lit. A 1)

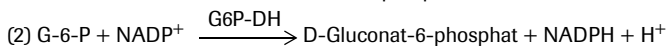
Es wird der D-Glucose-Gehalt vor und nach enzymatischer Hydrolyse der Saccharose bestimmt.

D-Glucosebestimmung 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).



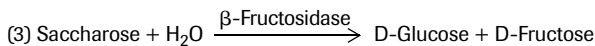
Das entstehende D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) wird von Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP) in Gegenwart von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) spezifisch zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert, wobei reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) entsteht (2).



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.

Enzymatische Inversion:

Saccharose wird durch das Enzym β -Fructosidase (Invertase) bei pH 4,6 zu D-Glucose und D-Fructose hydrolysiert (3).



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

Herstellung der Lösungen

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

Stabilität der Reagenzien

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

Bestimmungsansatz

Wellenlänge¹: 340 nm, Hg 365 nm oder Hg 334 nm
Glasküvette²: 1,00 cm Schichtdicke
Temperatur: 20-25°C
Testvolumen: 3,020 ml
Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette) oder gegen Wasser
Probelösung: 4-150 µg Saccharose + D-Glucose/Testansatz³ (in 0,100-1,800 bzw. 2,000 ml Probevolumen)

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)

In Küvetten pipettieren	Leerwert Saccharose-Probe	Saccharose-Probe	Leerwert D-Glucose-Probe	D-Glucose-Probe
Lösung 3* 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 3 vor Pipettierung auf 37°C bringen) stehen lassen. Zugabe von				
Lösung 1 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 ₁). Reaktion starten durch Zugabe von				
Suspension 2	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 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.				

* Lösung 3 und Probelösung jeweils auf den Boden der Küvette pipettieren, durch Schütteln mischen. Bei Verwendung eines Rührspatels diesen erst unmittelbar vor der Extinktionsmessung E₁ 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 konstante Extinktionszunahmen festgestellt, werden die Extinktionen E₂ auf die Zeit der Zugabe von Suspension 2 (HK/G6P-DH) extrapoliert.
Für Leerwerte und Proben Extinktionsdifferenzen (E₂-E₁) berechnen. Extinktionsdifferenzen der Leerwerte von Extinktionsdifferenz 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 $\Delta E_{\text{Saccharose}}$.

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).

Berechnung

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

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

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

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

d = Schichtdicke [cm]

ϵ = Extinktionskoeffizient von NADPH bei:

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

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

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

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:

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

- 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.
- Anstelle von Glasküvetten sind auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.
- S. Hinweise zur Testdurchführung



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:

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

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

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Menge an Saccharose + D-Glucose 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-Konzentration zwischen 0,10 und 1,5 g/l bzw. 0,05 und 0,8 g/l liegt.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge an Saccharose + D-Glucose 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 (ΔE) zu klein (z.B. < 0,100), so ist die Probelösung erneut herzustellen (höhere Einwaage oder weniger starke Verdünnung), oder das in die Küvette zu pipettierende Probevolumen (v) ist bis auf 2,000 ml zu erhöhen (D-Glucose-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 der Berechnungsformel entsprechend einzusetzen.

Ist die geschätzte Saccharosekonzentration geringer als 0,2 g/l, so kann die im Testschema angegebene Inkubationszeit bei der Einwirkung von β-Fruktosidase auf Saccharose von 15 min auf 5 min herabgesetzt werden.

2. Technische Hinweise

Ist das Verhältnis D-Glucose : Saccharose grösser als z.B. 10:1, ist die Präzision der Bestimmung von Saccharose beeinträchtigt. Es sollte zur Verbesserung der Präzision bei der Bestimmung der Saccharose der Überschuss an D-Glucose mit Glucose-Oxidase/Katalase weitgehend zerstört werden. Man verfährt wie am Beispiel "Honig" unter Pkt. 11 ausgeführt.

3. Spezifität der Bestimmung

β-Fruktosidase spaltet die β-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 β-Fruktosidase D-Glucose und D-Fruktose bestimmt werden und das Verhältnis dieser Monosaccharide 1:1 beträgt. Überwiegt der D-Fruktose-Anteil, so sind 2 β-Fruktosane in der Probe enthalten. Die Bestimmung der D-Glucose (und der D-Fruktose) bei zusätzlicher Verwendung des Enzyms Phosphoglucose-Isomerase, PGI) 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) bzw. D-Glucosemonohydrat (Molmasse 198,17) sind Ergebnisse von unter 100% zu erwarten, da die Substanzen feuchtigkeitsempfindlich sind.

4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt bei der Bestimmung von D-Glucose 0,005 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen v = 2,000 ml und Messung bei 340 nm einer D-Glucose-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/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 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 ca. 4 µg Saccharose + D-Glucose/Ansatz (2 mg Saccharose + D-Glucose/l Probelösung; Probevolumen v = 1,800 ml) und 150 µg Saccharose + D-Glucose/Ansatz (1,5 g Saccharose + D-Glucose/l Probelösung; Probevolumen v = 0,100 ml).

6. Präzision

Bei einer Doppelbestimmung von D-Glucose, 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 D-Glucose-Konzentration von ca. 4-8 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. 0,04-0,08 g/100 g.)

Bei einer Doppelbestimmung von Saccharose (bei Anwesenheit von D-Glucose in der Probe) ist, ausgehend von einer Probelösung, 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:

Fruchtsaft:

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

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

$$\text{D-Fruktose: } r = 0,15 + 0,033 \times (c_{\text{D-Fruktose}} \text{ in g/l}) \text{ g/l} \\ R = 1,05 + 0,0452 \times (c_{\text{D-Fruktose}} \text{ in g/l}) \text{ g/l} \quad (\text{Lit. D 2.9})$$

Flüssigvollei:

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

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

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

Weitere Daten: s. Literatur

Wein:

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

7. Erkennen von Störungen

7.1 Ist die Umsetzung von D-Glucose 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 (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.

Die Verwendung von "einfachen" und "doppelten" Probevolumina bei der Doppelbestimmung ist die einfachste Möglichkeit der Testkontrolle bei der Messung von Saccharose.

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

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 Wiederfinden

ungsversuche 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 und D-Glucose 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 Probenvolumen bis 2,000 ml (D-Glucose) 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);

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

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

Trübe Säfte filtrieren (alternativ mit Carrez-Reagenzien klären) und soweit verdünnen, dass die Saccharose- + D-Glucose-Konzentration etwa 0,1 bis 1,5 g/l betragen. 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-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 und D-Glucose in Wein

Wein wie unter „Fruchtsäfte“ angegeben vorbehandeln. Auch stark gefärbte Südwine brauchen nicht entfärbt zu werden (s. auch Pkt. 11).

Bestimmung von Saccharose und D-Glucose in Bier

Etwa 5-10 ml Bier im Becherglas ca. 30 s mit einem Glasstab zur Entfernung der Kohlensäure rühren oder durch Faltenfilter filtrieren. Die weitgehend CO₂-freie Probe kann unverdünnt zum Test eingesetzt werden.

Bestimmung von Saccharose in gezuckerter Kondensmilch und Speiseeis

Ca. 1 g Probe in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, etwa 60 ml Wasser hinzufügen und 15 min bei ca. 70°C halten. Kolben gelegentlich

umschwenken. Zur Klärung 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g Kaliumhexacyanoferrat(II), $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$ ml), 5 ml Carrez-II-Lösung (7,20 g Zinksulfat, $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$ ml) und 10 ml NaOH (0,1 M) hinzufügen, nach jeder Zugabe mischen, auf 20-25°C bringen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen, filtrieren. Klare, evtl. leicht opaleszente Lösung zum Test einsetzen, entsprechend Verdünnungstabelle vorher verdünnen.

Bestimmung von Saccharose und D-Glucose in Konfitüre

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

Bestimmung von Saccharose in Schokolade

Etwa 1 g fein geraspelte Schokolade in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, ca. 70 ml Wasser hinzufügen und im Wasserbad 20 min bei 60-65°C erhitzen. Gelegentlich umschütteln. Nach vollständigem Suspendieren der Schokolade auf 20-25°C abkühlen und Messkolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Zur Abscheidung des Fettes mindestens 20 min im Kühlschrank stehen lassen. Die kalte Lösung durch ein mit der Lösung angefeuchtetes Filterpapier filtrieren. Die ersten ml des Filtrats verwerfen. Klares Filtrat, ggf. gemäss Verdünnungstabelle verdünnt, zum Test einsetzen. Alternativ kann auch mit Carrez-Reagenzien geklärt werden (s. Pkt. 9).

Bestimmung von Saccharose und D-Glucose in (Röst)-Kaffee

Ca. 1 g gemahlener Kaffee in 100 ml-Messkolben mit etwa 60 ml heissem Wasser (90°C) übergiessen, 5 min mit Magnetrührer rühren. Auf 20-25°C abkühlen und Magneten entfernen. Zur Abtrennung von Farbstoffen mit Carrez-Reagenzien klären wie bei „gezuckerter Kondensmilch und Speiseeis“ beschrieben (s. oben). Klares, evtl. noch schwach gefärbtes Filtrat zum Test einsetzen: v = 0,100 ml bei Rohkaffee, v = 0,500 ml bei Röstkaffee (geändertes Probenvolumen bei der Berechnung berücksichtigen).

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

Bestimmung von Saccharose und D-Glucose 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.

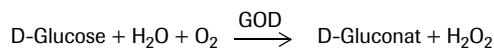
a) D-Glucose-Bestimmung

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

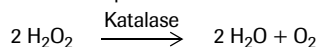
b) Saccharose-Bestimmung

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 β -Fructosidase je < 0,01%, Katalase

Triethanolamin-hydrochlorid

MgSO₄ × 7 H₂O, 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, H₂O₂ als Substrat) zugeben, mischen.

Pufferlösung:

5,6 g Triethanolamin-hydrochlorid und 0,1 g MgSO₄ × 7 H₂O mit 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 (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 Pharmazeutika, Tabak (Lit. B 3.7), Papier (Lit. A 2.2) und in der Forschung bei der Analytik biologischer Proben.

Bestimmung von Saccharose und D-Glucose 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 Enteisung mittels Carrez-Lösungen erfolgen. Siehe die oben beschriebenen Anwendungsbeispiele.) Gallertartige Agar-Medien mit Wasser homogenisieren und wie oben beschrieben weiter behandeln.

Literatur

A. Literatur zur Bestimmung von Saccharose und D-Glucose

- A 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
- A 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
- A 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)
- A 2.3 Schweiz. 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, Kakaomasse, Kakaopulver und Schokoladenpulver)/7.2 (1992)

- A 2.4 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau **77**, 3 (Glucose), 11 (Saccharose)
- A 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
- A 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)
- A 2.7 Deutsche Norm DIN 10326 (Februar 1986) Bestimmung des Gehaltes an Saccharose und Glucose in Milchprodukten und Speiseeis; Enzymatisches Verfahren,
- A 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.)
- A 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 herleid 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
- A 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)
- A 2.11 RSK-Values, The Complete Manual, Guide Values and Ranges of Specific Numbers for Fruit Juices and Nectars, Including the Revised Methods of Analysis (1987), 1st ed., Verlag Flüssiges Obst/Liquid Fruit, D-56370 Eschborn, pp. 145-148
- A 2.12 Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, VDLUFA (1988) Methodenbuch Band VI: Enzymatische Bestimmung des Glucose- und Saccharosegehaltes von Milchprodukten; C20.3
- A 2.13 Nederlandse Norm NEN 2858 (1e druk, oktober 1989) Vruchtesappen: Bepaling van het saccharosegehalte; Enzymatische methode (Fruit juices - Determination of the sucrose content - Enzymatic method)
- A 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)
- A 2.15 Deutsche Norm DIN EN 12146 (Okt. 1996) Frucht- und Gemüsesäfte, Teil 4: Enzymatische Bestimmung des Saccharosegehalts; Spektralphotometrisches Verfahren mit NADP
- A 2.16 Nederlandse Norm NEN-EN 12146 (Oktober 1996) Vruchten- en groentesappen. Enzymatische Bepaling van het gehalte aan saccharose. NADP-spectrometrische methode
- A 2.17 Standard der Russischen Föderation / Standard of the Russian Federation / GOSSTANDART ROSSII GOST R 51258-99 (1999) Milk and milk products. Method for determination of sucrose and glucose content

D-Glucose-Testkontroll-Lösung (Flasche 5)

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 Probenmaterialien.

Anwendung:

- Zusatz der D-Glucose-Testkontroll-Lösung zum Ansatz D-Glucose-Probe:**
Die Testkontroll-Lösung wird anstelle der Probelösung zur Bestimmung eingesetzt.
- "Quantitativer Nachstart":**
Nach Ablauf der Reaktion mit Probelösung und Messung von E₂ werden 0,050 ml der Testkontroll-Lösung zum Probeansatz gegeben. Nach Ablauf der Reaktion (ca. 15 min) wird die Extinktion E₃ gemessen. Aus der Differenz (E₃-E₂) 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.
- Interner Standard:**
Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung von D-Glucose (keine groben Fehler bei Testansatz; Probe ist frei von Hemmstoffen) kann die Testkontroll-Lösung als interner Standard verwendet werden:

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

mischen, nach ca. 3 min Extinktionen der Lösungen messen (E₁). 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 ist nicht stabil. Deshalb enthält die Test-Combination keine Saccharose-Testkontroll-Lösung.

* Als wasserfreie D-Glucose angeben

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

- B 2.1 Fuchs, G. & Wretling S. (1979) Bestämning av fruktos, glukos och sackaros i livsmedel, Vår Föda **31**, 435-439
- B 2.2 Bundesverband der Deutschen Feinkostindustrie e.V. Bonn; Analysenmethoden: Bestimmung des Zuckergehaltes in Tomatenmark (enzymatisch), IV/61 (Dezember 1979)
- B 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)
- B 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 teilladapierter Säuglingsnahrung auf Milchbasis, 48.01-3 (Mai 1985); Bestimmung des Gesamtzuckergehaltes in Speisesenf, 52.06-5 (Dezember 1991); Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose in Eiern und Eiprodukten, 05.00-10 (Dezember 2003)
- B 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, 1st Edition
- B 2.6 Österreichisches Lebensmittelbuch (Codex Alimentarius Austriacus), Kapitel B29: Senf; Erlass vom 27. Oktober 1989 (s. ERNÄHRUNG/NUTRITION **14**, 168-170 (1990))
- B 3.1 Drawert, F. (1964) Enzymatische Analyse von Glucose, Fructose, Saccharose und Sorbit in Weinen und Traubenmosten, VITIS **4**, 185-187
- B 3.2 Trautner, K. (1969) Enzymatische Zuckerbestimmungen, Zeitschrift für Ernährungswissenschaft, Suppl. 8, Seiten 40-45
- B 3.3 Somogyi, J.C. & Trautner, K. (1974) Der Glucose-, Fructose- und Saccharosegehalt verschiedener Gemüsearten, Schweiz. Med. Wochenschrift **104**, 177-182
- B 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
- B 3.5 Zürcher, K. & Hadorn, H. (1976) Veränderungen des Zuckerspektrums eines Sirups während der Lagerung, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **67**, 136-139
- B 3.6 Zürcher, K. & Hadorn, H. (1976) Vergleichende Zuckerbestimmungen mit gaschromatographischen, enzymatischen und reduktometrischen Methoden, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **72**, 197-202
- B 3.7 Sekin, S. (1978) Enzymatic Determination of Glucose, Fructose and Sucrose in Tobacco, Tobacco Sci. **23**, 75-77; Tobacco International **181**, 27-29
- B 3.8 Polascsek-Rác, M., Pauli, M. P., Horváth, G. & Vámos-Vigyázó (1981) Enzymatic determination of the sugars in red pepper, Z. Lebensm. Unters. Forsch. **172**, 115-117

C. Literatur zur Bestimmung von D-Glucose

- C 1.1 Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F. & Stork, H. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, 1241-1246; Verlag Chemie, Weinheim, und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 2nd ed., vol. III, pp. 1196-1201; Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
- C 1.2 Kunst, A., Draeger, B. & Ziegenhain, J. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) 3rd ed., vol. VI, pp. 163-172, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- C 2.1 Brautechnische Analysenmethoden, Band II, S. 400-402 (1979), Methodensammlung der Mitteleuropäischen Analysenkommission (MEBAK), herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising
- C 2.2 Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 61B (Enzymatische Bestimmungen)/1.1 (1981)
- C 2.3 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau **77**, 3 (Glucose)
- C 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 Diätbrot für Diabetiker (als Gesamtglucose), 49.01.05-1 (Mai 1984)
- C 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
- C 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

D. Literatur zur Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose

- D 1.1 Schmidt, F.H. (1961) Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander, Klinische Wochenschrift **39**, 1244-1247
- D 1.2 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
- D 1.3 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
- D 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
- D 2.2 Lafon-Lafourcade, S., Lafitte, M. & Joyeux, A. (1977) Dosage du Glucose et du Fructose Residuels dans les Vins par Methode Enzymatique, Office International de la Vigne et du Vin, n° 600/F.V. 634
- D 2.3 Deutsche Norm DIN 10381 (April 1979) Untersuchung von Stärke und Stärkeerzeugnissen; Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose in derselben Untersuchungsprobe (Enzymatisches Verfahren)
- D 2.4 Methodenbuch für Weinanalysen in Österreich (1980), herausgegeben von Arbeitsgemeinschaft der Landw. Versuchsanstalten in Österreich (ALVA)
- D 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 (Gärungssüssig)/8.1 (1994)
- D 2.6 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau **77**, 3 (Glucose) und 9-10 (Fructose)
- D 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
- D 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)
- D 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)
- D 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
- D 2.11 Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (1990), 15th ed., vol. 2, pp. 741-742 (1985.09)
- D 2.12 Die Methode ist zugelassen bei der Untersuchung von Wein im Rahmen der Qualitätsprüfung in Rheinland-Pfalz (1985; Landwirtschaftskammer in Bad Kreuznach) und in Hessen (1986, Ministerium für Landwirtschaft und Forsten).
- D 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
- D 2.14 Methodensammlung der internationalen Fruchtsaft-Union (IFU, Analysenmethoden, 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.).
- D 2.15 RSK-Values, The Complete Manual, Guide Values and Ranges of Specific Numbers for Fruit Juices and Nectars, Including the Revised Methods of Analysis (1987), 1st ed., Verlag Flüssiges Obst/Liquid Fruit, D-56370 Eschborn, pp. 97-100
- D 2.16 Nederlandse Norm NEN 2857 (1e druk, oktober 1989) Vruchtessappen: Bepaling van het glucose- en fructosegehalte; Enzymatische methode (Fruit juices - Determination of the glucose and fructose content - Enzymatic method)
- D 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
- D 2.18 Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 272 (3 Okt. 1990), Rechtsvorschriften: Verordnung (EWG) Nr 2676/90 der Kommission vom 17 September 1990 zur Festlegung gemeinsamer Analysenmethoden für den Weissektor (S. 61-63)
- D 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 ; Fruit and vegetable juices; Enzymatic determination of D-glucose and D-fructose content; NADPH spectrophotometric method
- D 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
- D 2.21 Standard der Russischen Föderation / Standard of the Russian Federation / GOSSTANDART ROSSII GOST R 51240-98 (1998) Fruit and vegetable juices. Determination of D-glucose and D-fructose content
- D 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
- D 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
- D 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
- D 3.4 Kubadinow, N. (1974) Die enzymatische Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose in Zuckerrüben und Betriebsäften der Zuckerproduktion und Vergleich ihrer Ergebnisse mit den Werten der Berliner Institutsmethode, Zucker **27**, 72-78
- D 3.5 Schiweck, H. & Büsching, L. (1974) Das Verhalten von Glucose und Fructose während der Zuckerfabrikation, Zucker **27**, 122-128
- D 3.6 Schultze, K.W. & Rummel, M. (1975) Beispiel für die Anwendung von Enzymen bei der pharmazeutischen Analyse, Acta Pharmaceutica Technologica **21**, 167-170
- D 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
- D 3.8 Motz, R.J. (1976) Enzymatische Zuckerbestimmung, Zucker und Süßwarenwirtschaft **29**, 75-77
- D 3.9 Wagner, K. & Kreutzer, P. (1977) Zusammensetzung und Beurteilung von Auslesen, Beeren- und Trockenbeerenauslesen, Die Weinwirtschaft **10**, 272-275
- D 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
- D 3.11 Klingebiel, L., Grossklaus, R. & Pahlke, G. (1979) Erfahrungen mit der enzymatischen Bestimmung von Zucker und Zuckeraustauschstoffen in Diabetikerwaren, Z. Lebensm. Unters. Forsch. **169**, 359-360
- D 3.12 Wucherpfennig, K., Otto, K. & Yueh-Chyng Huang (1986) Aussagekraft des Glucose-Fructose-Verhältnisses, Die Weinwirtschaft-Technik **122**, 254-260
- D 3.13 Millies, K. D., Sponholz, W.R. & Eberle, C. (1988) Methoden zur Zuckerbestimmung, Weinwirtschaft - Technik, Heft 6, S. 6-11
- D 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

Hinweis

zur Test-Combination Saccharose/D-Glucose

Diese Packung enthält eine Saccharose-Testkontroll-Substanz (s. Flasche 4). 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 ($v = 0,100$ 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 3*	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 1	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 2	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_c berechnen.

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

Standardabweichung s_c : g/l

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

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

$$s_A = \frac{s_c \text{ [g/l]} \times 100}{\text{Einwaage [g/l]}} = \frac{\text{} \times 100}{\text{}} = \text{} \text{ g/100 g}$$

Bewertung der Standardabweichung

Standardabweichung $s_A \leq 0,79$ g/100g:

Die Präzision der Bestimmung ist einwandfrei.

Standardabweichung $s_A > 0,79$ 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 ($\Delta = 100$ g/100 g) = ΔA

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

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

1 Walter, E. (1980) Zur Prüfung der Laborausstattung für enzymatische Bestimmungen, *alimenta* **19**, 159-164

2 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

Ebenso verfügbar:

Test-Combination D-Glucose, Best. Nr. 10 716 251 035

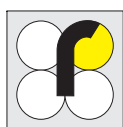
Test-Combination D-Glucose/ D-Fructose, Best. Nr. 10 139 106 035

Test-Combination Maltose/Saccharose/D-Glucose, Best. Nr. 11 113 950 035

Test-Combination Saccharose/D-Glucose/D-Fructose, Best.Nr. 10 716 260 035

Test-Combination Sorbit/ Xylit, Best. Nr. 10 670 057 035

Test-Combination Stärke, Best. Nr. 10 207 748 035



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

