

Maltose/Saccharose/ D-Glucose

UV-Test

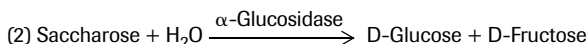
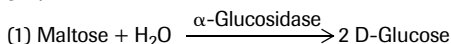
zur Bestimmung von Maltose, Saccharose und D-Glucose in Lebensmitteln und anderen Probematerialien

Best. Nr. 11 113 950 035

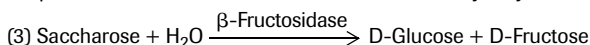
Test-Combination für je 15 Bestimmungen

Prinzip (Lit. 1)

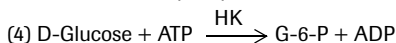
Maltose und Saccharose werden durch das Enzym α -Glucosidase (Maltase) bei pH 6,6 in zwei Moleküle D-Glucose bzw. in D-Glucose und D-Fructose gespalten (1, 2).



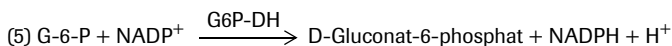
Ausserdem wird Saccharose durch das Enzym β -Fructosidase (Invertase) bei pH 4,6 ebenfalls zu D-Glucose und D-Fructose hydrolysiert (3).



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) (4).



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 (5).



Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der Saccharose-Menge, der D-Glucose-Menge und der halben Maltose-Menge äquivalent. NADPH ist Messgrösse und aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm zu bestimmen.

Die Test-Combination enthält

- Flasche 1 mit ca. 0,2 g Lyophilisat, zusammengesetzt aus: Citratpuffer, pH ca. 6,6; α -Glucosidase, ca. 210 U
- Flasche 2 mit ca. 0,5 g Lyophilisat, zusammengesetzt aus: Citratpuffer, pH ca. 4,6; β -Fructosidase, ca. 720 U
- Flasche 3 mit ca. 7,2 g Pulvergemisch; zusammengesetzt aus: Triethanolamin-Puffer, ca. pH 7,6; NADP, ca. 110 mg; ATP, ca. 260 mg; Magnesiumsulfat
- Flasche 4 mit ca. 1,1 ml Suspension, zusammengesetzt aus: Hexokinase, ca. 320 U; Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, ca. 160 U

Herstellung der Lösungen

- Inhalt der Flasche 1 mit 6 ml bidest. Wasser lösen.
- Inhalt der Flasche 2 mit 10 ml bidest. Wasser lösen.
- Inhalt der Flasche 3 mit 45 ml bidest. Wasser lösen.
- Inhalt der Flasche 4 unverdünnt verwenden.

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 -20 bis -25°C 2 Monate haltbar.
Lösung 1 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.
Lösung 2 ist bei 2-8°C 4 Wochen, bei -20 bis -25°C 2 Monate haltbar.
Lösung 2 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.
Lösung 3 ist bei 2-8°C 4 Wochen, bei -20 bis -25°C 2 Monate haltbar.
Lösung 3 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.

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

1 Das Absorptionsmaximum von NADPH liegt bei 340 nm. Bei Verwendung von Spektralphotometern wird im Absorptionsmaximum, bei Verwendung von Spektrallinienspektrometern mit Hg-Dampflampe bei einer Messstrahlung von 365 nm oder 334 nm gemessen.
2 Anstelle von Glasküvetten sind auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.
3 S. Hinweise zur Testdurchführung

BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM
Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik

Nur zur Verwendung in der Lebensmittelhygiene.

Lagern bei 2-8°C

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

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: 4-100 μ g Maltose + Saccharose + D-Glucose/Testansatz³
(in 0,100-0,700 ml Probevolumen)

In Küvetten pipettieren	Leerwert Maltose-Probe	Maltose-Probe	Leerwert Saccharose-Probe	Saccharose-Probe	Leerwert D-Glucose Probe	D-Glucose Probe
Lösung 1*	0,200 ml	0,200 ml	-	-	-	-
Lösung 2*	-	-	0,200 ml	0,200 ml	-	-
Probelösung**	-	0,100 ml	-	0,100 ml	-	0,100 ml

mischen*, 20 min bei 20-25°C stehen lassen.

Lösung 3 bidest. Wasser	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
	1,800 ml	1,700 ml	1,800 ml	1,700 ml	2,000 ml	1,900 ml

mischen***, nach ca. 3 min Extinktionen der Lösungen messen (E₁). Reaktion starten durch Zugabe von

Suspension 4	0,020 ml	0,020 ml	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 (E₂).

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 1, Lösung 2 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, so werden die Extinktionen E₂ auf die Zeit der Zugabe von Suspension 4 (HK/G6P-DH) extrapoliert.

Für Leerwerte und Proben Extinktionsdifferenzen E₂-E₁ berechnen. Die Extinktionsdifferenzen der Leerwerte von den Extinktionsdifferenzen der zugehörigen Proben abziehen.

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

Man erhält

$$\Delta E_{\text{Maltose-Probe}} \cdot \Delta E_{\text{Saccharose-Probe}} \text{ und } \Delta E_{\text{D-Glucose-Probe}}$$

Die Differenz aus $\Delta E_{\text{Maltose-Probe}}$ und $\Delta E_{\text{Saccharose-Probe}}$ ergibt $\Delta E_{\text{Maltose}}$

Die Differenz aus $\Delta E_{\text{Saccharose-Probe}}$ und $\Delta E_{\text{D-Glucose-Probe}}$ 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:

$$c = \frac{V \times MG}{\epsilon \times d \times v \times 1000 (\times 2)^*} \times \Delta E \text{ [g/l]}$$

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 Maltose:

$$c = \frac{3,020 \times 342,3}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000 \times 2} \times \Delta E_{\text{Maltose}} = \frac{5,169}{\epsilon} \times \Delta E_{\text{Maltose}} \text{ [g Maltose/l Probelösung]}$$

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:

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

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:

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

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

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

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Menge an Maltose + Saccharose + D-Glucose zwischen 8 µg und 100 µg (Messung bei 365 nm) bzw. 4 µg und 50 µg (Messung bei 340, 334 nm) betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz soll die Probelösung eine Maltose- (einschliesslich Saccharose und D-Glucose-) Konzentration von 0,10-1,0 g/l (Messung bei 365 nm) bzw. 0,05-0,5 g/l (Messung bei 340, 334 nm) haben; gegebenenfalls ist zu verdünnen.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge an Maltose + Saccharose + D-Glucose im Liter		Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor F
Messung bei			
340 oder 334 nm	365 nm		
< 0,5 g	< 1,0 g	-	1
0,5-5,0 g	1,0-10 g	1 + 9	10
5,0-50 g	10-100 g	1 + 99	100
> 50 g	> 100 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 0,700 ml (Maltose-Ansatz) bzw. 1,800 ml (Saccharose-Ansatz) bzw. 2,000 ml (D-Glucose-Ansatz) zu erhöhen. In diesem Fall ist das Volumen der hinzuzufügenden Wassermenge entsprechend zu verringern, so dass in den Ansätzen für Probe und Leerwert das gleiche Testvolumen vorliegt. Das geänderte Probevolumen v ist in der Berechnungsformel entsprechend einzusetzen.

* Nur bei der Bestimmung von Maltose

2. Technische Hinweise

Ist das Verhältnis D-Glucose zu Maltose + Saccharose in der Probe grösser als z.B. 10 : 1, so sollte zur Verbesserung der Präzision bei der Bestimmung von Maltose und Saccharose D-Glucose mit Glucose-Oxidase in Anwesenheit von Luft-Sauerstoff weitgehend entfernt werden (Einzelheiten s. Pkt. 10).

3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

α -Glucosidase spaltet Maltose, Saccharose sowie Maltotriose, Turanose, 2-O- α -D-Glucosido-D-erythrose und Maltitol (4-O- α -D-Glucopyranosyl-D-sorbit). Andere α -Glucoside wie α , α -Trehalose, Maltopentaose, Maltohexaose und höhere Oligoglucoside, sowie Dextrine und Stärke werden nicht gespalten. Unter den angegebenen Reaktionsbedingungen werden Maltotetraose zu ca. 5%, Isomaltose zu ca. 15% und Palatinose (O- α -D-Glucopyranosyl (1 \rightarrow 6)-D-fructofuranose) zu ca. 40% gespalten. Kohlenhydrate mit β -glucosidischen Bindungen, z.B. Lactose, Lactulose, Cellobiose, aber auch Raffinose, werden nicht gespalten.

β -Fructosidase spaltet die β -fructosidische Bindung in Saccharose und anderen Oligoglucosiden. 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 -Fructosidase D-Glucose und D-Fructose bestimmt werden und das Verhältnis dieser Monosaccharide 1:1 beträgt. Überwiegt der D-Fructose-Anteil, so sind 2 β -Oligofructosane in der Probe enthalten. „Polyfructose“ (z.B. Inulin) wird nicht gespalten.

Die Bestimmung der D-Glucose 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) und Maltose sind Ergebnisse von unter 100% zu erwarten, da die Substanzen u.a. feuchtigkeitsempfindlich sind. (Maltose-Präparate können auch D-Glucose enthalten.)

4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze (Lit. 1.2)

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 von Maltose und Saccharose beträgt (bei Anwesenheit von D-Glucose in der Probe) die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, jeweils 0,010 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen v = 0,700 ml und Messung bei 340 nm einer Maltose-Konzentration von 1 mg/l Probelösung (bei v = 0,100 ml entsprechend 8 mg/l Probelösung), bei der Bestimmung von Saccharose bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen v = 1,800 ml einer Konzentration von 1 mg/l Probelösung (bei v = 0,100 ml entsprechend 15 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von 2 mg Maltose/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,020 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probevolumen v = 0,700 ml.

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 Maltose + Saccharose + D-Glucose/Ansatz (2 mg Maltose + Saccharose + D-Glucose/l Probelösung; Probevolumen v = 1,800 ml) bis 100 µg Maltose + Saccharose + D-Glucose/Ansatz (1 g Maltose + 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 Konzentration von 4-8 mg D-Glucose/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 0,04-0,08 g/100 g.)

Bei einer Doppelbestimmung von Maltose und 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 Konzentration von 8-12 mg Maltose/l bzw. 15-25 mg Saccharose/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 0,08-0,12 g Maltose/100 g bzw. 0,15-0,25 g Saccharose/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten für die Bestimmung von Maltose veröffentlicht:

$$VK = 1,7-2,1 \% \quad \text{Maltoselösungen} \quad (\text{Lit. 1.2})$$

Kinder-Zweiback:

$$x = 2,9 \text{ g/100 g} \quad r = 0,260 \text{ g/100 g} \quad s_{(r)} = \pm 0,092 \text{ g/100 g}$$

$$R = 0,461 \text{ g/100 g} \quad s_{(R)} = \pm 0,163 \text{ g/100 g} \quad (\text{Lit. 2.3})$$

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 Maltose oder Saccharose ist nicht möglich, da nach Änderung der Reaktionsbedingungen von pH 6,6 bzw. pH 4,6 auf pH 7,6 ("Umpufferung") Maltose und Saccharose nicht mehr gespalten werden.

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 Maltose bzw. 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 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 Maltose, 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 Probevolumen bis 2,000 ml (D-Glucose) bzw. bis 0,700 ml (Maltose) bzw. bis 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 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) (Bestimmung von D-Glucose);

stark gefärbte Proben mit Polyamid oder Polyvinylpolypyrrolidon (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.

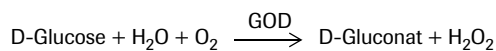
Carrez-Klärung:

Geeignete Probemenge in einem 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 mischen, Messkolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren.

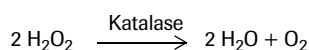
Die Entweiessung Protein-haltiger Proben mit Perchlorsäure oder Trichloressigsäure darf in Anwesenheit von Saccharose und Maltose in der Probe nicht durchgeführt werden, da diese Disaccharide vollständig oder teilweise unter Freisetzung von D-Glucose hydrolysiert werden. Es wird die Carrez-Klärung empfohlen.

10. Besondere Vorbereitung der Probe zur Maltose- und Saccharose-Bestimmung bei hohem D-Glucose-Überschuss

Ist das Verhältnis D-Glucose zu Maltose und Saccharose grösser als z.B. 10 : 1, so ist die Präzision der Maltose- und Saccharose-Bestimmung beeinträchtigt. In diesem Fall sollte D-Glucose weitgehend entfernt werden: In Gegenwart von Glucose-Oxidase (GOD) und Luftsauerstoff wird D-Glucose zu D-Gluconat oxidiert:



Wasserstoffperoxid wird durch Katalase zerstört:



Reagenzien

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

Katalase

Triethanolamin-hydrochlorid

$MgSO_4 \times 7 H_2O$

NaOH, 4 M

Herstellung der Lösungen für 10 Bestimmungen

Enzymlösung:

5 mg GOD (Δ ca. 1000 U) mit 0,750 ml bidest. Wasser lösen, 325 KU Katalase (aus Rinderleber; 25°C, H_2O_2 als Substrat) zugeben, mischen.

Pufferlösung:

5,6 g Triethanolamin-hydrochlorid und 0,1 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 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. Die klare Lösung zur Bestimmung der Maltose und Saccharose einsetzen. Im Parallel-Ansatz Rest-D-Glucose bestimmen und wie üblich bei der Berechnung berücksichtigen.

11. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch anwendbar in der Forschung bei der Analytik von biologischen Proben. Zur Behandlung der Probe siehe Lit. 1.2.

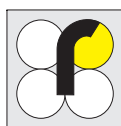
Literatur

- 1.1 Gutmann, I. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1230-1233, Verlag Chemie, Weinheim, und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1185-1188, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
- 1.2 Beutler, H.-O. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 119-126, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel
- 2.1 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau **77**, 10-11 (Maltose), 11 (Saccharose) und 3 (D-Glucose)
- 2.2 Brautechnische Analysenmethoden, Band III, S. 589-592 (1982), Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising
- 2.3 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Maltose in Kinder-Zwieback und Zwiebackmehl, 48.02.07-2 (Mai 1985)
- 3.1 Drawert, F. & Hagen, W. (1970) Enzymatische Analysenmethoden zur Bestimmung von Würze- und Bierinhaltsstoffen: II. Bestimmung von Maltose neben Saccharose, Glucose und Fructose in Würze und Bier; Verhalten der Zucker während der Gärung und Lagerung, Brauwissenschaft **23**, 95-101
- 3.2 Postel, W., Drawert, F. & Hagen, W. (1977) Enzymatische Differenzierung der Zucker in Malz-, Nähr- und Süßbieren: I. Enzymatische Analyse von Glucose, Fructose, Saccharose und Maltose, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **67**, 107-110 und 195-202 (II. Zusammensetzung und Beurteilung)

Weitere Literatur s. Test-Combination Saccharose/D-Glucose (Best. Nr. 10 139 041 035)

Weitere Hinweise siehe Arbeitsanleitungen zu

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

