

Methoden zur Untersuchung von Papier, Karton und Pappe für Lebensmittelverpackungen und sonstige Bedarfsgegenstände

5. Bestimmung von Einzelsubstanzen

5.26 Saccharose, Glukose

1. Allgemeine Angaben

Saccharose $C_{12}H_{22}O_{11}$ MC = 342,3
 Glukose $C_6H_{12}O_6$ MG = 180,16

Bezeichnung in der Empfehlung XXXVI: Saccharose, Glukose
 Ordnungsnummer: C II 5, Feuchthaltemittel

Stand: März 1979

Analytisches Messprinzip: Photometrie

Bearbeiter: E. Petermann und I. Vetter*, G. Henniger**

* Herzberger Papierfabrik, Ludwig Osthusenrich GmbH & Co. KG, Andreasberger Straße 1, 3420 Herzberg/Harz.

** Boehringer Mannheim GmbH, Bahnhofstraße 9-15, 8132 Tutzing.

2. Grundlagen des Verfahrens

Die zu untersuchende Probe wird zerkleinert, mit Wasser extrahiert und im Extrakt werden Saccharose und Glukose nebeneinander bestimmt, d. h., dass der Glukosegehalt vor und nach der enzymatischen Hydrolyse der Saccharose bestimmt wird. Die Glukose wird bei pH 7,6 mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP) in Gegenwart des Enzyms Hexokinase (HK) zu Glukose-6-phosphat (G6P) phosphoryliert. G6P wird mit Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADP) durch eine mit Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) katalysierte enzymatische Reaktion spezifisch zu Glukonat-6-phosphat oxidiert, wobei reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADPH) entsteht. NADPH ist der Glukosemenge äquivalent und kann aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm bestimmt werden. Zur Bestimmung der Saccharose wird der Probelösung das Enzym β -Fructosidase (Invertase) zugegeben, das bei pH 4,6 die Saccharose zu Glukose und Fructose hydrolisiert. Die Glukosebestimmung nach enzymatischer Inversion (Gesamtglukose) erfolgt unter den schon beschriebenen Bedingungen. Aus der Differenz der Glukosekonzentration vor und nach der enzymatischen Inversion wird der Gehalt an Saccharose berechnet.

3. Chemikalien und Lösungen

Es sind ausschließlich Reagenzien des Reinheitsgrades „zur Analyse“ und frisch bidestillierte Wasser zu verwenden.

Chemikalie	Konzentration	Sonstige Angaben
Natronlauge	c = 0,2 mol/l	Na OH
Natronlauge	c = 5 mol/l	Na OH
Citrat-Pufferlösung	c = 0,32 mol/l	pH = 4,6; 6,9 g Citro

		nensäure ($C_6H_8SO_7 \cdot H_2O$) und 9,1 g tri-Natriumcitrat-2-hydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$) werden in ca. 150 ml Wasser gelöst, mit Natronlauge ($c=0,2$ mol/l) auf pH 4,6 eingestellt und mit Wasser auf 200 ml aufgefüllt (Haltbarkeit: bei +4° C mind. 1 Jahr).
β -Fruktosidase-Lösung	$c = 5$ mg/ml	10 mg β -Fruktosidase werden mit 2 ml Wasser gelöst (Haltbarkeit: bei +4° C mind. 1 Woche).
Pufferlösung	$c = 0,75$ mol/l Triethanolamin $c = 10$ mmol/l Mg^{2+}	pH 7,614, 0 g Triethanolamin-Hydrochlorid und 0,25 g Magnesiumsulfat ($Mg SO_4 \cdot 7 H_2O$) werden in 80 ml Wasser gelöst, mit ca. 5 ml NaOH ($c=5$ mol/l) auf pH 7,6 eingestellt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt (Haltbarkeit: bei +4° C mind. 4 Wochen).
Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat-Lösung	$c =$ ca. 11,5 mmol/l	NADP; 60 mg NADP- Na_2H werden mit 6ml Wasser gelöst (Haltbarkeit: bei +4° C mind. 4 Wochen).
6 Adenosin-5'-triphosphat-Lösung	$c =$ ca. 81 mmol/l	ATP; 300 mg ATP- Na_2H_2 und 300 mg Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) werden in 6 ml Wasser gelöst (Haltbarkeit: bei +4° C mind. 4 Wochen).
Hexokinase/Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase	2 mg HK/ml, 1 mg G6P-DH/ml	HK/G6P-DH die Suspension ist bei +4° C mind. 1 Jahr haltbar
Polyamidpulver oder Polyvinylpolypyrrolidon	k. A.	k. A.

Tabelle 1 Chemikalien und Lösungen

4. Geräte

- 4.1 Spektrallinienfilter-Photometer mit Messmöglichkeit bei 365 nm oder Spektralphotometer (340 nm)
- 4.2 Glasküvetten, Schichtdicke 0,5 cm, 1,0 cm, DIN 58936, Teil 1
- 4.3 Analysenwaage, Messgenauigkeit 0,0001 g
- 4.4 Messkolben mit Kegelschliffhülse und Stopfen, 200 ml, 100 ml, DIN 12664
- 4.5 Messpipetten, 10 ml, 2 ml, 1 ml, 0,2 ml, 0,1 ml, DIN 12621
- 4.6 Trichter, DIN 12445

- 4.7 Glasfaserfilter (vor Gebrauch sind die Filter mehrmals mit heißem Wasser zu waschen)
- 4.8 Aufschlaggerät, z. B. Ultra Turrax
- 4.9 Bechergläser, HF 250, DIN 12331
- 4.10 Messzylinder, 250 ml, 100 ml, DIN 12680
- 4.11 pH-Messgerät mit Glaselektrode
- 4.12 Beheizbarer Magnetrührer mit Rührkern

5. Probenahme und Probenvorbereitung

5.1 Probenahme

Die Probenahme erfolgt nach DIN 53101. Damit keine Veränderung der Probe bis zur Durchführung der Prüfung eintritt, ist die Probe in Aluminiumfolie einzuschlagen.

5.2 Probenvorbereitung

Die Probe wird in Schnitzel von ca. 1 X 1 cm Kantenlänge zerschnitten. Außerdem sind für die Bestimmung der Flächenmasse nach DIN 53104, Teil 1, und zur Bestimmung des Trockengehaltes nach DIN 53103 gesondert mengengerechte Anteile zu entnehmen.

6. Bestimmung der Flächenmasse nach DIN 53104, Teil 1

7. Bestimmung des Trockengehaltes nach DIN 53103

8. Extraktion der Probe

Von der zerschnittenen Probe werden ca. 1 g auf 0,0001 g genau gewogen, in ein 250 ml-Becherglas gegeben, mit ca. 50 ml Wasser übergossen und mit einem Aufschlaggerät zerfasert. Das Aufschlaggerät wird anschließend sorgfältig mit ca. 10 ml Wasser abgespült. Die vorbereitete Probe wird mit einem beheizbaren Magnetrührer 15 min bei 60° C gerührt. Nach dem Abkühlen wird die Probe quantitativ in einen 100 ml-Messkolben übergeführt und mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Vor der Durchführung der Bestimmung wird die Probe über Glasfaserfilter filtriert, und der Extrakt wird für die Untersuchung eingesetzt.

Anmerkung: Bei Färbung der Probelösung ist mit Polyamidpulver oder Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) zu behandeln und über Glasfaserfilter zu filtrieren.

9. Durchführung

9.1 Bestimmung der Glukose

Von der vorbereiteten Probelösung (Extrakt) werden 2,0 ml in eine Küvette pipettiert, mit 1 ml Pufferlösung (siehe Tabelle 1), 0,1 ml NADP-Lösung (siehe Tabelle 1) und 0,1 ml ATP-Lösung (siehe Tabelle 1) versetzt und gut durchgemischt. Nach 3 min wird die Extinktion E_1 der Lösung gegen Luft gemessen, die Reaktion durch Zugabe von 0,02 ml HK/G6P-DH (siehe Tabelle 1) gestartet. Nach Stillstand der Reaktion (15 min) wird die Extinktion E_2 der Lösung gegen Luft gemessen. Ein Reagenzien

leerwert wird unter den gleichen Bedingungen wie beschrieben hergestellt, wobei anstelle der Probelösung 2,0 ml Wasser eingesetzt werden. Von der Extinktionsdifferenz der Probelösung wird die Extinktionsdifferenz des Leerwertes abgezogen, die Differenz ist der in die Berechnung als $\Delta E_{\text{Glukose}}$ einzusetzende Wert.

9.2 Bestimmung der Gesamtglukose

Von der vorbereiteten Probelösung werden 2,0 ml in eine Küvette pipettiert, mit 0,2 ml Citrat-Pufferlösung (siehe Tabelle 1) und 0,02 ml β -Fruktosidase-Lösung (siehe Tabelle 1) versetzt, gut durchgemischt und 15 min bei 20-25° C stengelassen. Nach Zugabe von 1,0 ml Pufferlösung (siehe Tabelle 1), 0,1 ml NADPLösung (siehe Tabelle 1) und 0,1 ml ATP-Lösung (siehe Tabelle 1) wird gut durchgemischt.

Nach 3 min wird die Extinktion E_1 der Lösung gegen Luft gemessen und die Reaktion durch Zugabe von 0,02 ml HK/G6P-DH (siehe Tabelle 1) gestartet. Nach Stillstand der Reaktion (15 min) wird die Extinktion E_2 der Lösung gegen Luft gemessen. Der Reagenzienleerwert wird unter den gleichen Bedingungen wie beschrieben hergestellt, wobei anstelle der Probelösung 2,0 ml Wasser eingesetzt werden. Von der Extinktionsdifferenz der Probelösung wird die Extinktionsdifferenz des Leerwertes abgezogen, die Differenz ist der in die Berechnung als $\Delta E_{\text{Gesamtglukose}}$ einzusetzende Wert.

9.3 Bestimmung der Saccharose

Für die Berechnung des Saccharosegehaltes wird die ermittelte Extinktionsdifferenz der Glukosebestimmung (9.1) nach Volumenkorrektur von der ermittelten Extinktionsdifferenz der Gesamtglukosebestimmung (9.2) abgezogen

$$(\Delta E_{\text{Saccharose}} = \Delta E_{\text{Gesamtglukose}} - \frac{3,22}{3,44} \cdot \Delta E_{\text{Glukose}})$$

$\Delta E_{\text{Saccharose}}$ ist der in die Berechnung des Saccharosegehaltes einzusetzende Wert. Pro Ansatz sollten nicht mehr als 5-150 μg Saccharose/Glukose vorliegen. Falls mit einem höheren Gehalt zu rechnen ist, ist das eingesetzte Probevolumen zu verringern, mit Wasser auszugleichen und in der Berechnung entsprechend zu berücksichtigen.

10. Auswertung

Es sind Parallelbestimmungen von mindestens zwei Proben durchzuführen. Die Auswertung erfolgt nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentrationen:

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

Hierin bedeuten:

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz (für Glukose=180,16; für Saccharose = 342,3)

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient (von NADPH bei λ 365 nm = 3,5 [$1 \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] bzw. 6,3 [$1 \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] bei 340 nm)

ΔE = Extinktionsdifferenz

Hieraus ergibt sich für die Glukosebestimmung unter den beschriebenen Bedingungen (d = 0,5 cm; λ = 365 nm):

$$c_1 = \frac{3,22 \cdot 180,16}{3,5 \cdot 0,5 \cdot 2 \cdot 1000} \cdot \Delta E_{Glukose} \text{ [g Glukose/l Probelösung]}$$

$$c_1 = 0,1657 \cdot \Delta E \text{ [g/l]}$$

$$c_1 = 16,57 \cdot \Delta E \text{ [mg/100 ml]}$$

Für die Bestimmung der Saccharose ergibt sich folgende Berechnung
($d = 0,5 \text{ cm}$; $\gamma = 365 \text{ nm}$):

$$c_2 = \frac{3,44 \cdot 342,3}{3,5 \cdot 0,5 \cdot 2 \cdot 1000} \cdot \Delta E_{Saccharose} \text{ [g Saccharose/l Probelösung]}$$

$$c_2 = 0,3364 \cdot \Delta E \text{ [g/l]}$$

$$c_2 = 33,64 \cdot \Delta E \text{ [mg/100 ml]}$$

10.1 Der Gehalt an Glukose G_{Glu} beträgt

a) bezogen auf die Trockenmasse der Probe in mg/kg:

$$G_{Glu1} = \frac{c_1 \cdot 1000}{m_{Tr}}$$

b) bezogen auf die Flächenmasse der Probe in mg/m²:

$$G_{Glu2} = \frac{m_A \cdot c_1}{m_E}$$

10.2 Der Gehalt an Saccharose G_{Sac} beträgt

a) bezogen auf die Trockenmasse der Probe in mg/kg:

$$G_{Sac1} = \frac{c_2 \cdot 1000}{m_{Tr}}$$

b) bezogen auf die Flächenmasse der Probe in mg/m²:

$$G_{Sac2} = \frac{m_A \cdot c_2}{m_E}$$

Hierin bedeuten:

m_A = Flächenmasse der Probe nach DIN 53104, Teil1, in g/m²

m_E = Einwaage der Probe in g

$c_1 = 16,57 \text{ } \mu\text{g/ml}$ Ein mg Glukose

$c_2 = 33,64 \text{ } \mu\text{g/ml}$ Ein mg Saccharose

m_{Tr} = Einwaage der Probe in g ,berechnet auf Trockengewicht nach DIN 53103

11. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind unter Hinweis auf diese Vorschrift anzugeben:

Art und Bezeichnung der Probe

Anzahl der Parallelbestimmungen

Trockengehalt der Probe nach DIN 53103

Flächenmasse der Probe in g/m² nach DIN 53104 Teil 1

Gehalt an Glukose in mg/kg bzw. in mg/m² nach 10.1.a oder 10.1.b

Gehalt an Saccharose in mg/kg bzw. in mg/m² nach 10.2.a oder 10.2.b

Einzelwerte und Mittelwert

Gegebenenfalls Abweichungen von dieser Vorschrift

Prüfdatum

12. Wiederfindungsrate

ca. 93 %

13. Nachweisgrenze

5µg (Glukose / Saccharose)

(2,5 mg Glukose-Saccharose / kg Extrakt)

14. Literatur

Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik 77/78, Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Postfach 31 01 20, 6800 Mannheim 31

Bergmeyer, H. U., Bernt E., in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.), Bd. 2, S. 1221-1224 (1974), Verlag Chemie, Weinheim

Handbuch für diätetische Lebensmittel, Analytik-Reinheitsanforderungen des Bundesverbandes der diätetischen Lebensmittelindustrie e. V., Bad Homburg, herausgegeben von der Fördergesellschaft Diätetische Lebensmittel mbH (1973)

15. Anmerkung

15.1 Für die enzymatische Saccharose/Glukose-Bestimmung sind Fertigreagenzien erhältlich, z.B. UV-Test zur Bestimmung von Saccharose und Glukose in Lebensmitteln, Bestell-Nr. 139041 der Fa. Boehringer Mannheim GmbH.

15.2 Für Routineuntersuchungen hat sich folgendes Pipettierschema bewährt:

In Küvetten pipettieren	Leerwert Glukose	Probe Glukose	Leerwert Saccharose	Probe Saccharose (Gesamtglukose)
Probe	-	2,00 ml	-	2,00 ml
Citrat-Puffer	-	-	0,20 ml	0,20 ml
β-Fruktosidase	-	-	0,02 ml	0,02 ml
			mischen und 15 min bei 20-25°C stehenlassen	
Puffer	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
Wasser	2,00 ml	-	2,00 ml	-
NADP	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml
ATP	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml

Mischen, nach 3 min Extinktion E_1 der Lösungen gegen Luft messen und Reaktion starten durch Zugabe von

HK/G6P-DH 0,02 ml 0,02 ml 0,02 ml 0,02 ml

Mischen, nach Stillstand der Reaktion (15 min) Extinktion E_2 der Lösungen gegen Luft messen.

Für Leerwerte und Proben Extinktionsdifferenzen E_2-E_1 bilden. Extinktionsdifferenz des jeweiligen Leerwertes von der Extinktionsdifferenz der entsprechenden Probe abziehen = ΔE . Extinktionsdifferenz für Saccharose berechnen nach

$$\Delta E_{\text{Saccharose}} = \Delta E_{\text{Gesamtglukose}} - \frac{3,22}{3,44} \Delta E_{\text{Glukose}}$$