Enzymatische Bestimmung von D-Sorbit in Lebensmitteln = Enzymatic determination of D-sorbitol in foods

Autor(en): **Meier, P. / Gramm, Barbara / Vögeli, U.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **76 (1985)**

Heft 3

PDF erstellt am: **23.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-982372

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **76**, 478–485 (1985)
Eingegangen 4. März 1985. Angenommen 8. Mai 1985

Enzymatische Bestimmung von D-Sorbit in Lebensmitteln

Enzymatic Determination of D-Sorbitol in Foods

P. Meier, Barbara Gramm und *U. Vögeli*
Kantonales Laboratorium, Bern

Einleitung

Eine schnelle und zuverlässige Sorbitbestimmung in Lebensmitteln ist aus verschiedenen Gründen von Interesse. Zum einen sieht die eidgenössische Lebensmittelverordnung vom 26. Mai 1936 (Stand 1. Januar 1983) Sorbit als einen der möglichen Zuckeraustauschstoffe für Diabetikernahrung vor. Zum anderen kann der Unterschied im Sorbitgehalt von Kern- bzw. Steinobstsaft einerseits und Traubensaft andererseits zum Nachweis von Verfälschungen benutzt werden (Wein, Traubensaft, Weinessig usw.).

In den letzten Jahren sind viele Arbeiten zur Bestimmung von Zuckeralkoholen mittels Dünnschichtchromatographie (1), Gaschromatographie (2–6) und HPLC (7–11) publiziert worden. Allen Methoden gemeinsam ist aber entweder ein erheblicher Zeitbedarf bei der Durchführung, eine aufwendige Apparatur oder eine durch andere Lebensmittelinhaltsstoffe verursachte Ungenauigkeit bei der Messung. Dagegen scheint eine einfache und spezifische Bestimmung dieses Zuckeralkohols auf enzymatischem Wege möglich zu sein. Von *Beutler* und *Bekker* (12) wurde eine Analysenvorschrift für D-Sorbit in Lebensmitteln mit Hilfe der Enzyme Sorbit-Dehydrogenase und Hexokinase beschrieben. Allerdings tritt beim vorgeschlagenen Reaktionsablauf Fructose als Zwischenprodukt auf. Diese Sorbitbestimmungsmethode wird daher durch hohe Fructosegehalte in einzelnen Lebensmitteln erheblich gestört. Das Ziel dieser Arbeit ist es, eine Möglichkeit zu zeigen, wie diese Schwierigkeit umgangen werden kann.

Wir wählten dazu folgendes Vorgehen:

1. Die im Lebensmittel enthaltenen reduzierenden Zucker werden in einem ersten Aufarbeitungsschritt durch eine Fehlingsche Reaktion zerstört.
2. Das dabei anfallende, die enzymatische Analyse störende Cu^{+}/Cu^{2+} wird mit Carrez-I-Lösung quantitativ gefällt. Dadurch wird ausserdem ein zusätzlicher Reinigungseffekt erzielt.

Experimenteller Teil

Prinzip der enzymatischen Reaktion

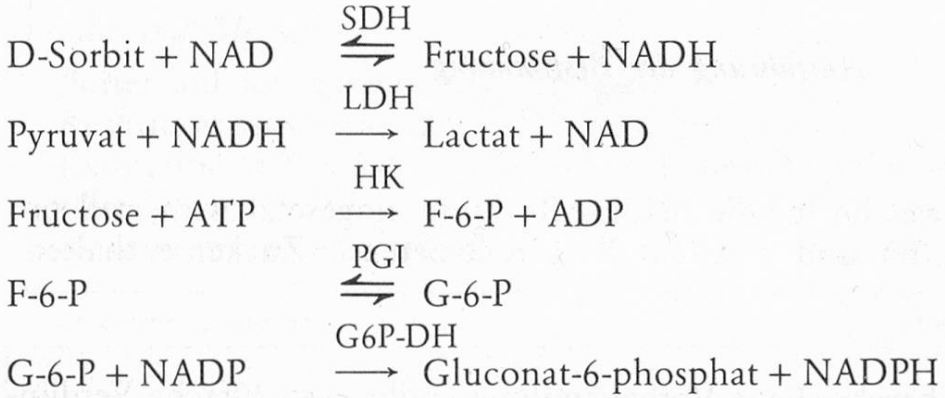
Nachdem die Probe in der obenerwähnten Art und Weise aufgearbeitet worden ist, wird der D-Sorbit zunächst in einer durch Sorbit-Dehydrogenase (SDH) katalysierten enzymatischen Reaktion mit NAD zu Fructose oxidiert. Hierbei wird NADH gebildet.

Nach Entfernen von NADH aus dem Reaktionsansatz mit Lactat-Dehydrogenase (LDH) und Pyruvat wird Fructose spezifisch nach der Hexokinase-Methode bestimmt:

In der durch Hexokinase (HK) katalysierten Reaktion von ATP mit Fructose entsteht Fructose-6-phosphat (F-6-P).

F-6-P wird durch Phosphoglucose-Isomerase (FGI) in Glucose-6-Phosphat (G-6-P) überführt.

Mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) wird G-6-P von NADP zu Gluconat-6-phosphat oxidiert. Die bei dieser Reaktion entstehende Menge NADPH ist der aus Sorbit gebildeten Fructose äquivalent.



Reagenzien

1. Puffer: 2,8 g Triethanolaminhydrochlorid und 0,05 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ in 10 ml bidest. Wasser lösen und mit 2 n NaOH das pH auf 8,0 einstellen. Mit bidest. Wasser auf 20 ml auffüllen. Dieser Puffer ist bei + 4 °C mindestens 4 Wochen haltbar.
2. NAD/NADP: 40 mg NAD (z. B. Boehringer Nr. 127329) und 20 mg NADP-Na_2 (z. B. Boehringer Nr. 127353) in 2 ml bidest. Wasser lösen. Diese Lösung ist bei + 4 °C mindestens 4 Wochen haltbar.
3. ATP: 100 mg ATP-Na_2H_2 (z. B. Boehringer Nr. 126888) und 100 mg $NaHCO_3$ in 2 ml bidest. Wasser lösen. Die Lösung ist bei + 4 °C mindestens 4 Wochen haltbar.
4. Pyruvat-Lösung: 20 mg Na-Pyruvat in 2 ml bidest. Wasser lösen. Die Lösung ist bei + 4 °C mindestens 1 Woche haltbar.

5. HK/G6P-DH/PGI: 180 U HK, 90 U G6P-DH und 250 U PGI in 1 ml 3,2 m Ammoniumsulfatlösung. Diese Suspension ist bei + 4 °C mindestens 1 Jahr haltbar. Auf diesen Test zugeschnittene Enzymsuspensionen sind im Handel erhältlich (z. B. 0,6 ml Boehringer Nr. 127183 für HK/G6P-DH und 0,4 ml Boehringer Nr. 127396 für PGI).
6. Lactat-Dehydrogenase (LDH): 225 U LDH in 0,04 ml 50prozentiger Glycerinlösung (z. B. Boehringer Nr. 127221) mit 0,36 ml bidest. Wasser verdünnen. Diese Lösung ist bei + 4 °C mindestens 5 Tage haltbar.
7. Sorbit-Dehydrogenase (SDH): 80 U SDH (z. B. 12 mg Lyophilisat Boehringer Nr. 109312) in 0,4 ml bidest. Wasser lösen. Diese Lösung ist bei + 4 °C mindestens 2 Wochen, eingefroren mindestens 4 Wochen haltbar.
8. Fehling-Lösung I: 35 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ zu 500 ml lösen.
9. Fehling-Lösung II: 175 g K-Na-tartrat · 4 H_2O und 50 g NaOH zu 500 ml lösen.
10. Carrez-Lösung I, 1+1 verdünnt: 75 g $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3\ H_2O$ zum Liter lösen.
11. Salzsäure, ca. 20%.
12. $FeCl_3$-Lösung, 1%.

Die Lösungen 1.–9. reichen theoretisch für 20 Bestimmungen.

Ausführung der Bestimmung

Probenvorbehandlung

Die Probelösung, welche für die Fehling-Reaktion eingesetzt wird, soll pro Liter 120–600 mg Sorbit und maximal 20 g reduzierende Zucker enthalten.

Messlösung

- Die im folgenden beschriebene Vorbehandlung ergibt eine 20fache Verdünnung, so dass die Messlösung 6–30 mg Sorbit pro Liter enthält, entsprechend einem ΔE_{340} von ca. 0,1 bis 0,5.
- Die 1 + 1 mit Wasser verdünnte Messlösung sollte eine Extinktion von 0,4 (gegen Luft gemessen) nicht überschreiten.

Entfernen der reduzierenden Zucker

- Fehling-Reaktion:
  Je 25 ml Fehling I und Fehling II in einem 400-ml-Becherglas mischen.
  Zum Kochen erhitzen (Siedestab).
  10 ml Probelösung zugeben und mit Uhrglas decken.
  2 Minuten leicht kochen (Stoppuhr).
- Abgekühlte Probe mit Salzsäure 20% langsam auf einen pH-Wert von ca. 4 bringen (Cu(I)-Oxid vollständig aufgelöst). Die dabei auftretende Fällung von Kaliumhydrogentartrat stört die Bestimmung nicht.
- Auf 100 ml auffüllen.

Quantitative Ausfällung der Kupferionen

- Von der gemäss obigem Abschnitt erhaltenen Suspension unter Rühren je 5 ml in 6 kleine Zentrifugengläser geben.
- Carrez I in 0,1 ml-Schritten wie folgt hinzufügen:
  1. Zentrifugenglas 0,9 ml
  2. Zentrifugenglas 1,0 ml usw.
- Mit der Tischzentrifuge 5 Minuten bei ca. 3000 Touren/Minute zentrifugieren.
- Zu jedem Überstand mit einer Pasteurpipette 5 Tropfen $FeCl_3$-Lösung geben und Farbveränderungen beobachten.
- Von der gemäss obigem Abschnitt erhaltenen Suspension unter Rühren 5,0 ml in einen 10-ml-Messkolben pipettieren.
- Diejenige Menge Carrez I zugeben, welche bei den in diesem Abschnitt aufgeführten Testproben gerade eine Blau- oder Blaugrünfärbung zu erzeugen vermochte.
- Auf 10 ml auffüllen.
- Zentrifugieren (siehe oben).
- Der Überstand ist die Messlösung, welche zum enzymatischen Test eingesetzt wird.

Ansatz und Messung

- Puffer auf Raumtemperatur bringen.
- Reaktionstemperatur 20–25 °C.
- Extinktionen bei 340 nm gegen Luft messen (keine Küvette im Referenzstrahl).
- Ausführung gemäss untenstehendem Pipettierschema.

In Küvetten pipettieren	Leerwert (ml)	Probe (ml)
Puffer (Reagenz 1)	1,00	1,00
NAD/NADP (Reagenz 2)	0,10	0,10
ATP (Reagenz 3)	0,10	0,10
Pyruvat (Reagenz 4)	0,10	0,10
Messlösung	–	1,50
Wasser	1,50	–
HK/G6P-DH/PGI (Reagenz 5)	0,05	0,05
LDH (Reagenz 6)	0,02	0,02
Mischen, nach ca. 3 min Extinktionen der Lösungen messen (E_1). Reaktion starten durch Zugabe von:		
SDH (Reagenz 7)	0,02	0,02
Mischen, nach 25 min Extinktionen der Lösungen messen (E_2).		

Berechnung des Sorbitgehaltes

Für Leerwert und Probe Extinktionsdifferenzen (E_2–E_1) bilden. Die Extinktionsdifferenz des Leerwertes von der Extinktionsdifferenz der Probe abziehen ($= \Delta E_{340}$). Daraus ergibt sich der Gehalt der Messlösung an D-Sorbit:

D-Sorbit, in g/l Messlösung

$$= \frac{2{,}89 \cdot 182{,}17}{1 \cdot 1{,}5 \cdot 6300} \cdot \Delta E_{340} = 0{,}0557 \cdot \Delta E_{340}$$

2,89 = gesamtes Volumen in der Küvette (ml)
182,17 = Molekulargewicht von Sorbit ($g \cdot mol^{-1}$)
1 = Schichtdicke (cm)
1,5 = Volumen der Messlösung (ml)
6300 = Extinktionskoeffizient von NADPH ($1 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors $f = 20$ (für die gemäss Seite 480f. durchgeführte Vorbehandlung) wird der Gehalt in der Probelösung in g D-Sorbit pro Liter berechnet.

Resultate und Diskussionen

Wiederfindung und Variationskoeffizient

Aus 8 Versuchen mit Standardgemischen Fructose/D-Sorbit (Fructose: D-Sorbit = 5 : 1 bis 200 : 1) resultierte eine Wiederfindung von 99,3% (97%–103%). Die Sorbitmenge in der Küvette betrug dabei ca. 10 μg, entsprechend einem ΔE von 0,1 bis 0,2. Für den Variationskoeffizienten *VK* erhielten wir ± 2,03%. Bei höheren Konzentrationen an D-Sorbit in der Küvette konnte keine wesentliche Veränderung dieser Parameter beobachtet werden.

Reaktionsverlauf

Die Reaktionszeit der enzymatischen Umsetzung wird durch die Vorbehandlung nicht sichtbar beeinflusst, nach spätestens 25 Minuten ist der Stoffumsatz beendet.

Schleichreaktionen wurden in der Regel nicht festgestellt, und auch Störungen konnten wir nie beobachten.

Mannit, Xylit und weitere Polyole stören die Reaktion nicht (12).

Anwendbarkeit und Grenzen

Die von *Beutler* und *Becker* (12) publizierte Vorschrift kann nur für diejenigen Fälle verwendet werden, welche ein Verhältnis Monosaccharide zu D-Sorbit von ⩽ 5 : 1 aufweisen, d. h. also vor allem für die mit Sorbit gesüssten Diabetikerprodukte.

In den anderen Lebensmitteln ist die erwähnte Voraussetzung nicht erfüllt, und es muss mit der in dieser Publikation vorgestellten Methode gearbeitet werden. Als Beispiele sind zu nennen: Fruchtsäfte, Konfitüren, Wein, Honigessig usw.

Da wir keinen Einfluss der Lebensmittelmatrix festgestellt haben, dürfte die Vorschrift generell anwendbar sein, doch sind folgende Grenzbedingungen zu beachten:

1. Die das Resultat bestimmende Extinktionsdifferenz sollte mindestens 0,1 betragen.
2. Das Verhältnis der reduzierenden Monosaccharide zu Sorbit darf höchstens 200 : 1 sein.
3. Bei Proben mit geringen Mengen an reduzierenden Zuckern und sehr kleinen Sorbitgehalten (Spurenbestimmung, z. B. in trockenen Weinen) kann in der Aufarbeitung das Verhältnis Fehling I/II zu Probelösung den jeweiligen Erfordernissen (mehr Probelösung) angepasst werden. Es ist allerdings darauf zu achten, dass in diesem Fall die auf Seite 481 beschriebene Testserie für die quantitative Eliminierung der Kupferionen nach unten erweitert werden muss (kleinere Zugaben von Carrez-I-Lösung); ausserdem ergibt die Aufarbeitung dann einen kleineren Verdünnungsfaktor.
   Auf diese Weise lassen sich im günstigsten Fall noch 10 ppm Sorbit mit guter Genauigkeit bestimmen.
4. Die beschriebene Methode wurde bei folgenden Lebensmitteln mit Erfolg angewendet:
   – Apfel- und Birnensaft
   – Weiss- und Rotwein
   – Weinessig
   – Honigessig
   – Apfelwein
   – Erdbeeren
   – Diät-Milchglace mit Fructose und Sorbit
   – Schokolade für Diabetiker

Zeitaufwand

Für eine Einzelbestimmung müssen 3–4 Stunden eingesetzt werden. Wird mit 6er-Serien gearbeitet, ergeben sich ca. 6 Stunden pro Serie bzw. 1 Stunde pro Probe.

Beurteilung der Aufarbeitungsmethode

Es ist leicht vorstellbar, dass die Fehling/Carrez-Aufarbeitung allgemein für diejenigen Fälle verwendet werden kann, wo reduzierende Zucker die Analyse stören, also z. B. bei der enzymatischen Bestimmung von wenig Saccharose neben viel Invertzucker (Honig, Fruchtsäfte usw.) oder der GC-Analyse von Zuckeralkoholen (Sorbit, Mannit, Xylit). Dadurch erhält sie eine Bedeutung, welche weit über den Rahmen dieser Arbeit hinausgeht.

Bei Lebensmitteln, welche sehr viel reduzierende Zucker neben sehr wenig Sorbit enthalten (z. B. Traubensaft), ist die beschriebene Aufarbeitungsmethode nicht mehr anwendbar. Es lässt sich aber folgende Variante denken: Nach der Fehling-Reaktion könnte die Lösung mit Hilfe eines Mischbettionenaustauschers entsalzt und anschliessend sehr stark eingeengt werden. Dadurch erhielte man für die Messung wieder eine genügend hohe Sorbitkonzentration. Wie weit ein solches Vorgehen praktikabel ist, bleibt eine offene Frage.

Dank

Den Mitgliedern der Subkommission 26 des Schweizerischen Lebensmittelbuches möchten wir für die wertvollen Vorarbeiten und Diskussionsbeiträge herzlich danken.

Zusammenfassung

Es wird eine breit anwendbare enzymatische Methode zur Bestimmung von D-Sorbit beschrieben. Störende Lebensmittelinhaltsstoffe, wie z. B. Monosaccharide, können durch eine Kombination von Fehling- und Carrez-Reaktionen entfernt werden. Die Bedeutung der Aufarbeitungsmethode wird verstärkt durch die Tatsache, dass sie nicht nur auf die Sorbitbestimmung beschränkt ist, sondern dass sie wesentlich allgemeiner verwendet werden kann.

Résumé

Une méthode enzymatique, au champ d'application très étendu, est décrite pour le dosage du D-sorbitol. Des substances gênantes comme les monosaccharides réducteurs peuvent être éliminées par un traitement préalable de l'échantillon à l'aide d'une combinaison des réactifs de Fehling et de Carrez.

Ce traitement présente un grand intérêt car son application peut être généralisée.

Summary

A widely applicable enzymatic method for the determination of D-sorbitol is described. Interfering substances such as reducing monosaccharides, present in foodstuffs, can be removed by a combination of Fehling and Carrez reactions.

The value of the preliminary treatment is increased by the fact that it is not restricted to the determination of D-sorbitol but can be used more generally.

Literatur

1. Wine. Determination of sorbitol. Romanian Standard STAS 6182/16–79, 5 pp., Institutul Roman de Standardizare, Romania 1979.
2. *Borys, A., Zawadzki, Z.* and *Pukala, I.:* Rapid method for determining sorbitol and monosaccharides in fruit products. Prace Instytutow i Laboratoriow Badawczych Przemyslu Spozywczego **25**, 469–481 (1975).
3. *Tsuda, T.* and *Nakanishi, H.:* Gas-liquid chromatographic determination of D-sorbitol in foods after separation by dialysis. J. Food Hyg. Soc. Japan **22**, 425–431 (1981).
4. *Daniels, D. H., Warner, C. R.* and *Fazio, T.:* Gas chromatographic determination of sorbitol, mannitol, and xylitol in chewing gum and sorbitol in mints. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **65**, 588–591 (1982).
5. *Moseley, F. A., Salinsky, J. S.* and *Woods, R. W.:* Gas-liquid chromatographic determination of sorbitol in cooked sausage products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **61**, 164–166 (1978).
6. *Bertrand, A.* and *Pissard, R.:* Determination of sorbitol in wines by gas chromatography of their acetylated derivatives. Ann. Fals. Exp. Chim. **69**, (742), 571–579 (1976).
7. *Schwarzenbach, R.:* Separation of some polyhydric alcohols by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. **140**, 304–309 (1977).
8. *Nachtmann, F.* and *Budna, K. W.:* Sensitive determination of derivatized carbohydrates by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. **136**, 279–287 (1977).
9. *Brandao, S. C. C., Richmond, M. L., Gray, J. I., Morton, I. D.* and *Stine, C. M.:* Separation of mono- and di-saccharides and sorbitol by high performance liquid chromatography. J. Food Sci. **45**, 1492–1493 (1980).
10. *Dokladalova, J., Barton, A. Y.* and *Mackenzie, E. A.:* High pressure liquid chromatographic determination of sorbitol in bulk sorbitol. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **63**, 664–666 (1980).
11. *Richmond, M. L., Brandao, S. C. C., Gray, J. I., Markakis, P.* and *Stine, C. M.:* Analysis of simple sugars and sorbitol in fruit by high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. **29**, 4–7 (1981).
12. *Beutler, H. O.* und *Becker, J.:* Enzymatische Bestimmung von D-Sorbit und Xylit in Lebensmitteln. Deut. Lebensm.-Rundsch. **73**, 182–187 (1977).

P. Meier
Barbara Gramm
Dr. U. Vögeli
Kantonales Laboratorium Bern
Muesmattstrasse 19
CH-3000 Bern 9