

Proben-Vorbereitung und Reinigung für enzymatische Analysen
Für 20 Proben

Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei +2 bis +8°C

Testprinzip

Der Enzytec Sample Purifier Kit (E2250) ist als pre-analytischer Schritt notwendig, z.B. bei der Bestimmung von Oxalsäure in Bier. Für andere Proben ist der Einsatz nicht unbedingt erforderlich.

Dieser Kit beinhaltet Aktivkohle, die in der Lage ist Geruch, Farbe und alle reduzierenden Substanzen zu eliminieren (inkl. Ascorbinsäure bis zu einer gewissen Konzentration).

Man unterscheidet zwei Aktionsweisen:

- chemisch, durch die oxidierende Aktivität von Sauerstoff, der in den Poren zwischen den Kohlenstoffmolekülen gelagert ist
- physikalisch-chemisch, u. a. durch die Adsorption und Blockierung von organischen Molekülen

Für die Durchführung des Enzytec™ Oxalsäure-Tests (E2100), bitte die Packungsbeilage beachten.

Reagenzien

Reagenz 1: **Sample Purifier**, 20 Röhrchen (Pulver aus Aktivkohle), gebrauchsfertig

Reagenz 2: **Sample Diluent**, 1 x 10 ml (flüssig, 5-fach Konzentrat); mit 40 ml bidest. Wasser verdünnen, vorsichtig und vollständig mischen; Stabilität: 3 Monate bei 2 - 8 °C.

Die Reagenzien sind bei 2 - 8 °C bis zum Ende der Haltbarkeit stabil (siehe Etikett), falls keine Kontamination während des Laboreinsatzes erfolgt.

Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur bringen. Vor dem Einsatz vorsichtig mischen. Nach dem Gebrauch sofort wieder verschließen. Die Reagenzien sorgfältig einsetzen, um Kontaminationen zu vermeiden.

Die Reagenzien sind nicht gefährlich. Trotzdem die allgemeinen Regeln beim Arbeiten in chemischen Laboratorien beachten. Nach Gebrauch die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgen. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

Probensammlung und Lagerung

In dem Enzytec Sample Purifier Kit (E2250) sollte kein **reines Standardmaterial** eingesetzt werden (Standard aus dem Enzytec Oxalsäure Kit (E2100) und auch kein anderer Standard), sondern nur Probenmaterial. Wenn man einen Standard einsetzt, kann es sein, dass ein Teil des Analyten (z.B. Oxalsäure), durch die Aktivkohle abgefangen wird und dies zu niedrigen Wiederfindungsraten führt.

a.) Lebensmittelproben

- Oxalsäure ist bei einem niedrigen pH-Wert stabil ($\text{pH} < 3,3$). Wenn der pH-Wert über 7,5 steigt, wird Oxalsäure in CO_2 umgewandelt und geht dadurch verloren. Eine Steigerung des pH-Wertes erhöht die Löslichkeit von Ca-Oxalat. Deshalb muss die Probenvorbereitung zwischen pH 5,0 und 7,0 durchgeführt werden. Dieser pH-Bereich ist hoch genug, um Ca-Oxalat in Lösung zu bringen und niedrig genug, um Oxalsäure zu schützen.
- Wenn es nicht notwendig ist Ca-Oxalat zu lösen, Probe auf pH 2,9 – 3,1 einstellen.
- In einigen Fällen müssen Oxalsäure und deren Salze in Lösung gebracht werden: Probe auf pH 3,0 mit HCl (1M) einstellen und in einem kochenden Wasserbad für 15 – 30 min inkubieren. Oxalsäure ist bei einem niedrigen pH-Wert stabil; die hohe Temperatur dient dazu die Hydrolyse von Ca-Oxalat zu forcieren. Es ist nicht notwendig den pH-Wert nach diesem Schritt zu korrigieren, da der pH von 3,0 für die Testbedingungen des Oxalsäure Kits geeignet ist.

b.) Sonstige Proben

- Die Proben (24 h Sammelproben) werden in einen Glas- oder Plastik-Behälter mit 10 ml konzentrierter HCl gesammelt. Probenvolumen (in Literangabe) notieren. Da diese Proben unter sauren Bedingungen gelagert sind, ist Oxalsäure stabil und die Proben können bis zu **7 Tagen** im Kühl- oder Gefrierschrank aufbewahrt werden.
- Frisch gesammelte Proben sollten einen Vitamin C-Gehalt von $< 16 \text{ mmol/l}$ haben, da höhere Konzentrationen das Ergebnis beeinträchtigen können.

Probenvorbereitung

1. "Sample diluent" (Reagenz 2) wie unter Reagenzien beschrieben vorbereiten.
2. Eine Serie von leeren Röhrchen für die Proben und die Kontrolle vorbereiten und entsprechend kennzeichnen.
3. 5 ml Probe bzw. Kontrolle in das jeweilige Röhrchen pipettieren (das Volumen kann reduziert werden, wenn keine 5 ml vorliegen).
4. 2,5 ml des gebrauchsfertigen "Sample Diluent" (Reagenz 2) und 2,5 ml bidest. Wasser in jedes Röhrchen pipettieren.
5. **Wichtiger Hinweis für die Oxalsäure Bestimmung** der pH-Wert muss zwischen 5,0 und 7,0 mit HCl (1 N) oder NaOH (1 N) eingestellt werden:
 - der pH des "Sample Diluent"-Puffers liegt bei 8,2 - 8,5
 - wenn die Probe mit HCl gesammelt wurde (siehe oben), liegt der pH-Wert nach Schritt 4 bei ca. 5,0 bis 7,0 und eine Korrektur ist in den meisten Fällen nicht notwendig
 - bei Lebensmittelproben die anders vorbereitet wurden (immer unter pH 7,0, siehe a), muss der "Sample Diluent" auf einen pH-Wert von 5,0 - 7,0 eingestellt werden, bevor er in Schritt 4 eingesetzt wird, so dass der pH-Wert der Probe nie über 7,0 liegt
6. Eine Serie von "Sample Purifier"-Röhrchen (Reagenz 1) für die Proben und die Kontrolle vorbereiten und entsprechend kennzeichnen.
7. Vier Milliliter von der verdünnten Proben bzw. Kontrolle (nach Punkt 4 und 5) in das jeweilige "Sample purifier" Röhrchen pipettieren (Punkt 6) und 5 min bis zur vollen Homogenisierung mischen (rotierenden Mixer).
8. Röhrchen für 10 - 15 min. bei 3500 rpm (2600 g) zentrifugieren oder mit einem Papierfilter filtrieren. Alternativ können auch 0,5 ml von der Probelösung in einen Ultrafilter pipettiert (z.B. Millipore Ultrafree-MC, UFC30HV00) und 3 min bei 4000 rpm zentrifugiert werden.
9. Probe aus der Mitte des Gesamtvolumens, nicht direkt an der Oberfläche entnehmen und in den Test einsetzen (z.B. Oxalsäure Test).
10. Für die Berechnung der Konzentration, müssen alle Ergebnisse mit dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert werden (wenn das Probenvolumen unter Punkt 3 geringer als 5 ml war, muss der Faktor neu berechnet werden).
11. **Der Oxalsäure-Standard aus dem Enzytec™ Oxalsäure Kit (E2100) liegt für den Testeinsatz gebrauchsfertig vor und darf nicht so vorbereitet werden.**

Hinweis:

Der Enzytec Sample Purifier Kit (E2250) kann zur Probenvorbereitung für den Oxalsäure Kit (E2100), aber auch für andere Tests aus der Enzytec Linie angewendet werden. In diesem Fall muss das Protokoll bezüglich der Proben und des jeweiligen Tests adaptiert werden:

die Probenmenge muss angesichts der zu messenden Konzentration angepasst werden
der pH-Wert muss unter Punkt 5 für den jeweiligen Test eingestellt werden

Die Wiederfindung sollte bei Aufstockungsversuchen zwischen 95 und 105% liegen.