

Raffinose

UV-Test

zur Bestimmung von Raffinose in Lebensmitteln und anderen Probematerialien

Best. Nr. 10 428 167 035

Test-Combination für 32 Bestimmungen

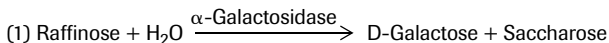
BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM
Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik

Nur zur Verwendung in der Lebensmittelhygiene.

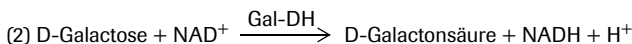
Lagern bei 2-8°C

Prinzip (Lit. 1)

Raffinose wird bei pH 4,5 mit Hilfe des Enzyms α -Galactosidase in D-Galactose und Saccharose gespalten (1).



D-Galactose wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart des Enzyms Galactose-Dehydrogenase (Gal-DH) zu D-Galactonsäure oxidiert (2).



Die während der Reaktion gebildete NADH-Menge ist der Raffinose-Menge äquivalent. NADH ist Messgröße und aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm zu bestimmen.

Durch dieses Prinzip ist eine Messung von Raffinose neben Saccharose und D-Glucose möglich.

Die Test-Combination enthält

1. Flasche 1 mit ca. 320 mg Lyophilisat, zusammengesetzt aus: Citrat-Puffer, pH ca. 4,5; NAD, ca. 28 mg
2. Flasche 2 mit ca. 1,6 ml Suspension α -Galactosidase, ca. 36 U
3. Flasche 3 mit ca. 34 ml Lösung, zusammengesetzt aus: Kaliumdiphosphat-Puffer, pH ca. 8,6
4. Flasche 4 mit ca. 1,6 ml Suspension β -Galactose-Dehydrogenase, ca. 30 U

Herstellung der Lösungen

1. Inhalt der Flasche 1 mit 8,0 ml bidest. Wasser lösen.
2. Suspension der Flasche 2 unverdünnt verwenden.
3. Lösung der Flasche 3 unverdünnt verwenden.
4. Suspension der Flasche 4 unverdünnt verwenden.

Stabilität der Lösungen

Der Inhalt der Flasche 1 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Lösung 1 ist bei 2-8°C 3 Monate, bei -15 bis -25°C 5 Monate haltbar.

Lösung 1 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.

Der Inhalt der Flaschen 2, 3 und 4 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

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: 3,400 ml

Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette) oder gegen Wasser

Probelösung: 3-250 μg Raffinose/Testansatz³ (in 0,100-0,500 ml Probelösung)

Enthält die Probelösung freie D-Galactose, so ist diese in einem gesonderten Ansatz **ohne Suspension 2** zu bestimmen.

In Küvetten pipettieren	Leerwert Raffinose-Probe	Raffinose-Probe	Leerwert D-Galactose-Probe	D-Galactose-Probe
Lösung 1* Probelösung**	0,200 ml -	0,200 ml 0,100 ml	0,200 ml -	0,200 ml 0,100 ml
Suspension 2 bidest. Wasser	0,050 ml 0,100 ml	0,050 ml -	- 0,150 ml	- 0,050 ml
mischen*, 15 min bei 20-25°C stehen lassen. Zugabe von				
Lösung 3 bidest. Wasser	1,000 ml 2,000 ml	1,000 ml 2,000 ml	1,000 ml 2,000 ml	1,000 ml 2,000 ml
mischen***, nach ca. 2 min Extinktionen der Lösungen messen (E ₁). Reaktion starten durch Zugabe von				
Suspension 4	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
mischen***, Stillstand der Reaktion abwarten (ca. 20 min) und Extinktionen der Lösungen messen (E ₂).				

* Lösung 1, Suspension 2, bidest. Wasser 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)

Für Leerwerte und Proben Extinktionsdifferenzen (E₂-E₁) bilden. Extinktionsdifferenz der Leerwerte von Extinktionsdifferenzen der jeweiligen Proben abziehen:

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

Man erhält $\Delta E_{\text{D-Galactose}}$ (aus "D-Galactose-Probe") und

$\Delta E_{\text{Raffinose + D-Galactose}}$ (aus "Raffinose-Probe")

Die Differenz dieser Werte ergibt $\Delta E_{\text{Raffinose}}$

Die gemessene Extinktionsdifferenz sollte zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Extinktionseinheiten betragen (s. "Hinweise zur Testdurchführung" und "Empfindlichkeit und Nachweisgrenze", Pkt. 3).

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 NADH bei:

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

$$\text{Hg } 365 \text{ nm} = 3,4 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

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

Hieraus ergibt sich für Raffinose:

$$c = \frac{3,400 \times 504,5}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E_{\text{Raffinose}} = \frac{17,15}{\epsilon} \times \Delta E_{\text{Raffinose}} \text{ [g Raffinose/l Probelösung]}$$

für D-Galactose:

$$c = \frac{3,400 \times 180,16}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E_{\text{D-Galactose}} = \frac{6,125}{\epsilon} \times \Delta E_{\text{D-Galactose}} \text{ [g D-Galactose/l Probelösung]}$$

Ist bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen worden, muss das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert werden.

1 Das Absorptionsmaximum von NADH liegt bei 340 nm. Bei Verwendung von Spektral-photometern wird im Absorptionsmaximum, bei Verwendung von Spektral-Linienphotometern mit Hg-Dampflampe bei einer Messstrahlung von 365 nm oder 334 nm gemessen.

2 Anstelle von Glasküvetten sind ggf. auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.

3 S. Hinweise zur Testdurchführung



Bei der Analyse fester und halbfester Proben, die für die Vorbereitung der Probe eingewägt werden, wird das Analysenergebnis auf die Einwaage bezogen:

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

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

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Raffinosemenge zwischen 5 µg und 250 µg (Messung bei 365 nm) bzw. 3 µg und 130 µg (Messung bei 340, 334 nm) betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit zu verdünnen, dass die Raffinosekonzentration zwischen 0,5 und 2,5 g/l, bzw. 0,25 und 1,3 g/l liegt.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge Raffinose im Liter		Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor F
Messung bei			
340 oder 334 nm	365 nm		
< 1,3 g	< 2,5 g	-	1
1,3-13 g	2,5-25,0 g	1 + 9	10
13-130 g	25,0-250 g	1 + 99	100

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 0,500 ml zu erhöhen. Probelösung ggf. auf 4,2-4,8 einstellen. In diesem Fall ist das Volumen der nach der Inkubation 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 zu berücksichtigen.

2. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

α -Galactosidase spaltet neben Raffinose auch andere α -Galactoside, z. B. Galactinol, Melibiose und Stachyose. Substanzen mit β -galactosidischen Bindungen, wie z. B. Lactose, werden nicht gespalten und stören - auch in hohen Konzentrationen - den Test nicht.

Gal-DH oxidiert ausser D-Galactose auch L-Arabinose. In Lebensmitteln ist mit der Anwesenheit geringer Mengen freier L-Arabinose nur dann zu rechnen, wenn diese durch chemische oder enzymatische Einwirkungen aus der natürlichen glycosidischen Bindung gelöst worden ist.

Bei der Analyse der Reinsubstanz Raffinose sind Ergebnisse von ca. 99 % zu erwarten.

3. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze (Lit. 1.2)

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen $v = 0,500$ ml und Messung bei 340 nm einer Raffinose-Konzentration von ca. 3 mg/l Probelösung (bei $v = 0,100$ ml entsprechend ca. 14 mg/l Probelösung) und einer D-Galactose-Konzentration von 1 mg/l Probelösung (bei $v = 0,100$ ml entsprechend 5 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von ca. 5 mg Raffinose/l bzw. 2 mg D-Galactose/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,010 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probevolumen $v = 0,500$ ml.

4. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von ca. 3 µg Raffinose + D-Galactose/Ansatz (5 mg Raffinose + D-Galactose/l Probelösung; Probevolumen $v = 0,500$ ml) und 250 µg Raffinose + D-Galactose/Ansatz (2,5 g Raffinose + D-Galactose/l Probelösung; Probevolumen $v = 0,100$ ml).

5. Präzision

Bei einer Doppelbestimmung von Raffinose (bei Anwesenheit von D-Galactose 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 25-40 mg Raffinose/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 0,25-0,4 g/100 g.)

Bei einer Doppelbestimmung von D-Galactose, ausgehend von einer Pro-

belösung, 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 5-10 mg D-Galactose/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 0,05-0,1 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten für die Bestimmung von Raffinose und D-Galactose veröffentlicht:

$$x = 39,8 \text{ mg/l} \quad \text{VK} = 2,6 \% \quad (\text{Lit. 1.1})$$

$$x = 130 \text{ µg/Test} \quad \text{Raffinose-Lösung} \quad \text{VK} = 0,26 \% \\ x = 220 \text{ µg/Test} \quad \text{Raffinose-Lösung} \quad \text{VK} = 0,43 \% \quad (\text{Lit. 1.2})$$

$$x = 25 \text{ µg/Test} \quad \text{D-Galactose-Lösung} \quad \text{VK} = 0,95 \% \\ x = 50 \text{ µg/Test} \quad \text{D-Galactose-Lösung} \quad \text{VK} = 0,64 \% \quad (\text{Lit. 1.4})$$

Milch und Milchprodukte:

$$\text{D-Galactose: } r = 0,10 \times (\text{Gehalt}_{\text{D-Galactose}} \text{ in g}/100 \text{ g}) \text{ g}/100 \text{ g} \\ R = 0,12 \times (\text{Gehalt}_{\text{D-Galactose}} \text{ in g}/100 \text{ g}) \text{ g}/100 \text{ g} \quad (\text{Lit. 2.1})$$

6. Erkennen von Störungen

6.1 Ist die Umsetzung von D-Galactose nach der unter "Bestimmungsansatz" angegebenen Zeit beendet, so kann im allgemeinen auf einen störungsfreien Ablauf geschlossen werden.

6.2 Nach Ablauf der Reaktion kann durch Zugabe von D-Galactose (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 Raffinose ist nicht möglich, da nach Änderung der Reaktionsbedingungen von pH 4,5 auf pH 8,6 ("Umpufferung") Raffinose nicht mehr gespalten wird.

6.3 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 Raffinose.

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.

6.4 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.

6.5 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.

7. Gefährlichkeit der Reagenzien

Die Reagenzien zur Bestimmung von Raffinose 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.

8. Allgemeine Hinweise zur Vorbereitung der Proben

Flüssige, klare, farblose und annähernd neutrale Proben direkt, nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle oder mit einem Probevolumen bis 0,500 ml zum Test einsetzen;

trübe Lösungen filtrieren (ggf. Membranfilter verwenden);

Kohlensäure-haltige Proben (z. B. durch Filtration) entgasen;

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.) enteiweissen;

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;

Emulsionen mit Carrez-Reagenzien behandeln.

Carrez-Klärung:

Geeignete Probemenge in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, ca. 60 ml bidest. Wasser hinzufügen. Flüssige Probe in einem 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.

9. Anwendungsbeispiele

Bestimmung von Raffinose in Melasse, Dicksaft und anderen Zuckerfabrikationsprodukten

In der Probe vorhandenes Galactinol wird vor der Bestimmung durch Zugabe von basischem Bleiacetat ausgefällt. Durchführung der Vorbereitung der Probe s. Lit. 2.3. Bei der Klärung werden Teile der Raffinose, z. B. bei der Analyse von Melasse, durch Adsorption am Niederschlag entfernt (s. Lit. 2.4).

Bestimmung von Raffinose in Soja- und Getreidemehlen

Etwa 2-5 g einer zerkleinerten und homogenisierten Probe in 100 ml-Messkolben genau einwiegen und mit ca. 50 ml Wasser in einem auf 60°C erhitzten Wasserbad 30 min erwärmen. Gelegentlich rühren (ersatzweise auch Magnetrührer). 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 Natronlauge (0,1 M) hinzufügen; nach jeder Zugabe jeweils schütteln, bzw. rühren. Auf 20-25°C abkühlen, Messkolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen, filtrieren. Klare, evtl. leicht trübe Lösung zum Test einsetzen, ggf. verdünnen.

(Sojamehl enthält bis zu 10 % Raffinose, Getreidemehle enthalten bis zu 0,3 % Raffinose.)

10. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch anwendbar bei der Analytik biologischer Proben.

Bestimmung von Raffinose 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 Enteiweissung mittels Carrez-Lösungen erfolgen. Siehe die oben beschriebenen Anwendungsbeispiele.)

Gallertartige Agar-Medien mit Wasser homogenisieren und wie oben beschrieben weiterbehandeln.

Literatur

- 1.1 Bergmeyer, H.U., Bernt, E. & Gutmann, I. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1217-1220; Verlag Chemie, Weinheim und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1172-1175; 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. 90-96, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- 1.3 Kurz, G. & Wallenfels, K. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse, (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1324-1327, Verlag Chemie, Weinheim, und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1180-1184 und 1279-1282, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc. New York and London
- 1.4 Beutler, H.O. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 104-112, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- 2.1 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung des Lactose- und Galactosegehalts von Milchprodukten (02.00-9/November 1983)
- 2.2 Schiweck, H. & Büsching, L. (1969) Die enzymatische Bestimmung des Raffinose- und Galactinolgehaltes in Zuckerfabrikprodukten über die bei der Spaltung entstehende Galactose mit Hilfe von Galactose-Dehydrogenase, Zucker **22**, 377-384
- 2.3 Schiweck, H. & Büsching, L. (1975) Die enzymatische Bestimmung des Raffinosegehaltes in Zuckerfabrikprodukten über die bei der Spaltung entstehende Galactose mit Hilfe von Galactose-Dehydrogenase, Zucker **28**, 242-243
- 2.4 Hollaus, F., Wieninger, L. & Braunsteiner, W. (1977) Erfahrungen mit der enzymatischen Raffinose-Bestimmung mittels Galactose-Dehydrogenase in Rüben und Zuckerfabrikprodukten, Zucker **30**, 653-658

Raffinose-Testkontroll-Lösung

Die Testkontroll-Lösung dient zur Kontrolle für die enzymatische Bestimmung von Raffinose in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien.

Reagenzien

Raffinose-penta-hydrat (M = 594,52 g/mol; enthält 84,9% Raffinose), p.A.

150 mg Raffinose-penta-hydrat auf 0,1 mg genau einwiegen und im Messkolben mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen und gründlich mischen (entspricht ca. 1,3 g Raffinose/l).

Lösung vor Gebrauch frisch herstellen. Ggf. kann die Lösung portionsweise eingefroren werden.

Anwendung:

1. Zusatz der Raffinose-Testkontroll-Lösung zum Testansatz:

Die Testkontroll-Lösung wird anstelle der Probelösung zur Bestimmung eingesetzt. (Zur Berechnung der Wiederfindung ist die Molmasse des verwendeten Testkontroll-Materials zu verwenden.)

Die Messung der Testkontroll-Lösung ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen.

2. "Quantitativer Nachstart":

Ein "quantitativer Nachstart" mit Testkontroll-Lösung nach Ablauf der Reaktion kann nicht ausgeführt werden, da unter den Bedingungen des Testansatzes (Kaliumdiphosphat-Puffer, pH 8,6) Raffinose nicht gespalten wird. Ggf. mit 0,050 ml einer D-Galactose-Lösung (0,5 g/l) "nachstarten".

3. Interner Standard:

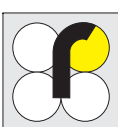
Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung (keine groben Fehler bei Testansatz; Probe ist frei von Hemmsubstanzen) kann die Testkontroll-Lösung als interner Standard verwendet werden:

In Küvetten pipettieren	Leerwert Raffinose-Probe	Raffinose-Probe	Raffinose-Standard	Raffinose-Probe + Raffinose-Standard
Lösung 1	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml
Suspension 2	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
Probelösung	-	0,100 ml	-	0,050 ml
Testkontroll-Lösung	-	-	0,100 ml	0,050 ml
bidest. Wasser	0,100 ml	-	-	-

mischen. 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:

$$\text{Wiederfindung} = \frac{2 \times \Delta E_{\text{Probe + Standard}} - \Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}} \times 100 [\%]$$



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

