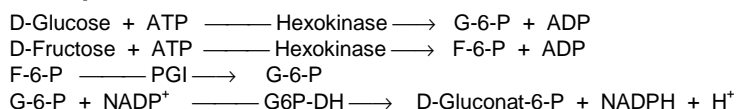


UV-Methode für ca. 32 Ansätze

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

Die Methode ist enthalten im deutschen, italienischen, österreichischen und schweizerischen Lebensmittelrecht, sowie in europäischen Verordnungen. Empfohlen z. B. IFU, AIJN, MEBAK, OICCC, OIV. Standardisiert von DIN, EN, GOST, NEN, NF. Anerkannt von der AOAC.

Prinzip



Ref.: Schmidt, F.H. (1961) Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander, Klinische Wochenschrift 39, 1244-1247

Durchführung der Bestimmung

Wellenlänge: 340 nm (NADPH), $\epsilon = 6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
 Schichtdicke: 1,00 cm (Glas; Plastikkuvette)
 Temperatur: +20 bis +25 °C
 Testvolumen: 3,020 ml (D-Glucose)
 3,040 ml (D-Fructose)
 Messung: gegen Luft oder Wasser
 Probelösung: 1 bis 100 µg D-Glucose + D-Fructose in 0,100 bis 2,000 ml Probelösung

Reagenzien

- # 1: Pulvermischung mit Triethanolamin-Puffer, pH ca. 7,6, ca. 80 mg NADP, ca. 190 mg ATP, Magnesiumsulfat (Stabilität siehe Packungsetikett). Inhalt der Flasche # 1 mit 31 ml bidest. Wasser lösen. Die Lösung ist 1 Monat bei +2 bis +8°C, bzw. 2 Monate bei -15 bis -25°C stabil.
- # 2: Ca. 0,7 ml Suspension Hexokinase (HK) / Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) (ca. 200 U / 100 U) in Ammoniumsulfat (Stabilität s. Packungsetikett). Die Suspension ist gebrauchsfertig. Flasche vorsichtig schwenken bevor die Suspension pipettiert wird.
- # F: Ca. 0,7 ml Suspension Phosphoglucose-Isomerase (PGI) (ca. 490 U) in Ammoniumsulfat (Stabilität s. Packungsetikett). Die Suspension ist gebrauchsfertig. Flasche vorsichtig schwenken bevor die Suspension pipettiert wird.

Zusätzlich wird benötigt (nicht im Kit enthalten):

Standard-Lösung D-Glucose, wasserfrei, ultrapur, 0,5 g/l zur Testkontrolle;
 Standard-Lösung D-Fructose, ultrapur, 0,5 g/l zur Testkontrolle.

Die Reagenzien zur Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose sind nicht gefährlich. Die allgemeinen Regeln beim Arbeiten in chemischen Laboratorien sollten jedoch eingehalten werden. Nach Gebrauch können die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgt werden. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

Bestimmungsansatz

In Küvetten pipettieren:	Leerwert	Standard ¹	Probe ²	Ansatz Duplikat Probe ³	Ansatz mit internem Standard ⁴	Ansatz für Spurenanalytik ⁵
Tea-Puffer, NADP, ATP, Lösung # 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Probelösung⁶ (z. B. 0,05 bis 0,5 g D-Gluc.+D-Fru./l)	-	-	0,100 ml	0,200 ml	0,100 ml	2,000 ml
Standardlösung ⁶ (z. B. 0,5 g D-Gluc. oder D-Fru./l)	-	0,100 ml	-	-	0,100ml	-
Bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	1,800 ml	1,800 ml	-
Mischen⁷, nach ca. 3 min Extinktionen (E₁) messen. Zugeben:						
HK/G6P-DH-Suspension # 2	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Mischen⁷, nach ca. 10 bis 15 min Extinktionen (E₂) messen. Extinktionsmessungen nach weiteren 2 min wiederholen⁸. Zugeben:						
PGI-Suspension # F	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Mischen⁷, nach ca. 10 bis 15 min Extinktionen (E₃) messen.						

Hinweise

- Das Mitführen eines "Standards" dient ausschließlich zur Erkennung von Unregelmäßigkeiten in der Analyse. Die Messung des Standards wird nicht benötigt zur Berechnung von Ergebnissen.
- Dieser Ansatz zusammen mit dem Leerwert ist eine "Einzelbestimmung".
- Im Fall einer "Doppelbestimmung" werden 2 Ansätze mit verschiedenen Probevolumina ausgeführt. Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein. Ergebnisse mit den entsprechenden Probevolumina v berechnen.
- Wiederfindung [%] = $[(\Delta E_{\text{Probe+Standard}} - \Delta E_{\text{Probe}}) / \Delta E_{\text{Standard}}] \times 100$
- In der Spurenanalytik wird empfohlen, das Probevolumen bis zu 2,000 ml zu erhöhen (0,0004 bis 0,05 g/l D-Glucose, bzw. D-Fructose/l).
- Vor der Dosierung Enzympipetten, bzw. Spitzen der Kolbenhubpipetten mit Probe- bzw. Standardlösung mehrfach vorspülen.
- z. B. mit einem Plastikspatel, oder durch Umschwenken nach Verschließen der Küvette mit Parafilm® (American Can Co., Greenwich Ct., USA).
- Die Reaktion ist beendet, wenn die gemessene Extinktion konstant ist. Ist dies nicht der Fall, die Ansätze, die die Probelösung enthalten, weiter in Abständen von 2 min messen, bis die Extinktionszunahme konstant ist. Extinktionen auf die Zeit der Zugabe von HK/G6P-DH (Suspension # 2) extrapolieren.

Berechnung

$$\Delta E_{D-Glucose} = (E_2 - E_1)_{\text{Probe bzw. Standard}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

$$\Delta E_{D-Fructose} = (E_3 - E_2)_{\text{Probe bzw. Standard}} - (E_3 - E_2)_{\text{Leerwert}}$$

$$c = (V \times MW \times \Delta E) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \text{ [g D-Glucose oder D-Fructose/l Probelösung]}$$

$$c = (3,020 \times 180,16 \times \Delta E) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,8636 \times \Delta E \text{ [g D-Glucose/l Probelösung]}}$$

$$c = (3,040 \times 180,16 \times \Delta E) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,8693 \times \Delta E \text{ [g D-Fructose/l Probelösung]}}$$

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

Bei der Analyse von Proben, die für die Analyse eingewogen werden, wird das Ergebnis auf die Einwaage bezogen:

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

Vorbereitung der Proben

Wird die Testdurchführung durch eine der untenstehenden Probeigenschaften beeinflusst, muss die entsprechende Probenvorbereitung durchgeführt werden:

1. *Klare, farblose, annähernd neutrale flüssige Proben* ggf. verdünnen, um eine Probelösung mit 0,05 bis 0,5 g D-Glucose + D-Fructose/l zu erhalten
2. *Trübe Lösungen* filtrieren oder zentrifugieren, ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
3. *Kohlensäurehaltige Proben*, z. B. durch Filtration entgasen, oder NaHCO₃ zugeben, bis die Lösung schwach alkalisch ist. Ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
4. *Saure (insbesondere leicht gefärbte) Lösungen* mit KOH oder NaOH auf pH 7 einstellen, einige Minuten inkubieren, oder im Fall von farblosen Proben ohne pH-Einstellung verdünnen (s. Pkt. 1).
5. *"Stark gefärbte Lösungen"*, die unverdünnt gemessen werden, mit PVPP oder Polyamid, z. B. 1 g/100 ml, behandeln, mischen, einige Minuten inkubieren, filtrieren.
6. *Feste Proben* zerkleinern (Korngröße < 0,3 mm), bzw. *halbfeste (pastöse) Proben* homogenisieren, mit Wasser extrahieren, oder in Wasser lösen, filtrieren und ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
7. *Fetthaltige Proben* mit heißem Wasser (Temperatur über dem Schmelzpunkt des Fettes), z. B. in einem 100 ml-Messkolben extrahieren. Auf +20 °C bringen, Messkolben bis zur Marke füllen. 15 min in Eis, bzw. 30 min in Kühlschrank stellen, filtrieren. Alternativ mit Carrez Reagenzien klären (wird empfohlen).
8. *Proteinhaltige Proben* mit Carrez-Reagenzien klären:
Ausreichende Menge der festen oder pastösen Probe in einen 100 ml-Messkolben einwiegen, ca. 60 ml Wasser zugeben. Oder flüssige Probe in einen 100 ml-Messkolben, der ca. 60 ml Wasser enthält, pipettieren. Nacheinander zugeben und nach jeder Zugabe mischen: 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g K₄[Fe(CN)₆]x3H₂O = Kalium-hexa-cyanoferrat(II)/100 ml), 5 ml Carrez-II-Lösung (7,20 g ZnSO₄ x 7 H₂O = Zink-sulfat-hepta-hydrat/100 ml). Durch Zugabe von z. B. 10 ml NaOH (0,1 M) pH auf 7,5 bis 8,5 einstellen. Messkolben bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren.
9. *Proben nur in Abwesenheit von Saccharose und Maltose mit Perchlorsäure deproteinieren.*

Eigenschaften des Tests

1. *Spezifisch* für D-Glucose und D-Fructose. Bei der Analyse von handelsüblicher D-Glucose, D-Fructose und von D-Glucose monohydrat sind Ergebnisse von < 100 % zu erwarten, da die Substanzen feuchtigkeitsempfindlich sind.
2. *Empfindlichkeit:* 0,2 mg/l D-Glucose oder D-Fructose (ΔE = 0,005; v = 2,000 ml; V = 3,020/3,040 ml)
3. *Nachweisgrenze:* 0,4 mg/l D-Glucose oder D-Fructose (ΔE = 0,010; v = 2,000 ml; V = 3,020/3,040 ml)
4. *Linearität:* von 1 µg D-Glucose+D-Fructose/Ansatz (v = 2,000 ml; V = 3,020/3,040 ml) bis 100 µg D-Glucose+D-Fructose/Ansatz (v = 0,100 ml; V = 3,020/3,040 ml)
5. *Präzision:*
ΔE = +/- 0,005 Extinktionseinheiten
VK = ca. 1 bis 2 %
Fruchtsaft: r = 0,42 + 0,027 x C_{D-Glucose} in g/l [g/l]
 r = 0,15 + 0,033 x C_{D-Fructose} in g/l [g/l]
 R = 1,0 + 0,042 x C_{D-Glucose} in g/l [g/l]
 R = 1,05 + 0,045 x C_{D-Fructose} in g/l [g/l]
Wein: r = 0,056 x C_{D-Glucose, bzw. D-Fructose} in g/l [g/l]
6. *Störungen:* keine bekannt
7. *Technische Information:* Die Reagenzien können auch zur Bestimmung von Saccharose (mit zusätzlicher β-Fruktosidase) verwendet werden.