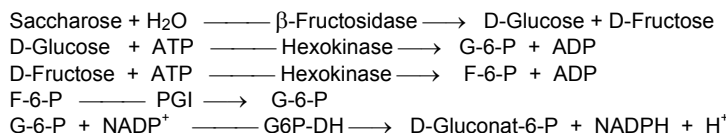


UV-Methode für je ca. 16 Ansätze

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

Die Methode ist enthalten im deutschen, niederländischen, österreichischen und schweizerischen Lebensmittelrecht. Empfohlen z. B. von IFU, AIJN, MEBAK, OICCC. Standardisiert von DIN, EN, GOST, NEN, NF.

Prinzip



Ref.: Bergmeyer, H.U. & Bernt, E. (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1176-1179, Verlag Chemie Weinheim / Academic Press Inc., New York and London; Schmidt, F.H. (1961) Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander, Klinische Wochenschrift 39, 1244-1247

Durchführung der Bestimmung

Wellenlänge: 340 nm (NADPH), $\epsilon = 6,3 \text{ (l x mmol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}\text{)}$
 Schichtdicke: 1,00 cm (Glas- oder Plastikkuvette)
 Temperatur: +20 bis +25°C
 Testvolumina: 3,020 ml (Saccharose, D-Glucose)
 3,040 ml (D-Fructose)
 Messung: gegen Luft oder gegen Wasser
 Probelösung: 4 bis 150 µg Saccharose + D-Glucose + D-Fructose in 0,100 bis 1,800 ml (Saccharose), bzw. 2,000 ml (D-Glucose, D-Fructose) Probelösung.

Reagenzien

- # S: Lyophilisat mit Citrat-Puffer, pH ca. 4,6, ca. 510 U β -Fructosidase (Stabilität s. Packungsetikett). *Inhalt der Flasche # S mit 7 ml bidest. Wasser lösen.* Die Lösung ist 1 Monat bei +2 bis +8 °C, bzw. 2 Monate bei -15 bis -25 °C stabil.
- # 1: Pulvermischung mit Triethanolamin-Puffer, pH ca. 7,6, ca. 80 mg NADP, ca. 190 mg ATP, Magnesiumsulfat (Stabilität s. 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 werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

Standard-Lösung Saccharose, ultrapur, 0,8 g/l zur Testkontrolle; 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 Saccharose, 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 Saccharose	Ansatz Saccharose-Standard ¹	Ansatz Saccharose-Probe ²	Leerwert D-Glucose/D-Fructose	Ansatz D-Glucose/D-Fructose-Probe	Ansatz mit internem Standard ³
Citrat Puffer, β -Fructosidase, Lösung # S	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	-	-	0,200 ml
Probelösung⁴ (z.B. 0,08 to 0,8 g Saccharose/l)	-	-	0,100 ml	-	0,100 ml	0,100 ml
Standardlösung ⁴ (z.B. 0,8 g Saccharose/l)	-	0,100 ml	-	-	-	0,100 ml
Mischen, z.B durch vorsichtiges Schütteln der Küvette. 15 min (5 min) bei +20 bis 25°C (+37°C) inkubieren. Zugeben:						
Tea-Puffer, NADP, ATP, Lösung # 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Bidest Wasser	1,800 ml	1,700 ml	1,700 ml	2,000 ml	1,900 ml	1,600 ml
Mischen⁵, 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
Mischen⁵, nach ca. 10 bis 15 min Extinktionen (E₂) messen. Extinktionsmessungen nach weiteren 2 min wiederholen⁶. Zugeben:						
PGI-Suspension # F	-	-	-	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Mischen⁵, nach ca. 10 bis 15 min Extinktionen (E₃) messen.						

Siehe Hinweise auf der nächsten Seite.

Berechnung

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

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

$$\Delta E_{\square \text{ Saccharose}} = [(E_2 - E_1)_{\text{Ansatz Saccharose}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert Saccharose}}] - [(E_2 - E_1)_{\text{Ansatz D-Glucose}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert D-Glucose}}]$$

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

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

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

$$c = (3,020 \times 342,3 \times \Delta E) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{1,641 \times \Delta E \text{ [g Saccharose/l Probelösung]}}$$

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:

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

Vorbereitung der Proben

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

1. *Klare, farblose, annähernd neutrale flüssige Proben* ggf. verdünnen, um eine Probelösung mit 0,08 bis 0,8 g Saccharose + 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. *Feste Proben* zerkleinern (Korngröße < 0,3 mm), bzw. *halb-feste (pastöse) Proben* homogenisieren, mit Wasser extrahieren, oder in Wasser lösen, filtrieren und ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
5. *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).
6. *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] x 3 H₂O (Kalium-hexacyanoferrat 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.
7. *Probe nicht mit Perchlorsäure deproteinieren, da Saccharose gespalten wird.*

Eigenschaften des Tests

1. *Spezifität:* Spezifisch für D-Glucose und D-Fructose. Relativ spezifisch für Saccharose in der Abwesenheit von 2-β-Fructosanen. (2-β-Fructosane, falls sie in der Probe enthalten sind, reagieren langsamer als Saccharose.) Bei der Analyse von handelsüblicher Saccharose sind Ergebnisse von 100 % zu erwarten, in der Analyse von D-Glucose, D-Glucose-monohydrat und D-Fructose Ergebnisse von < 100 %, da die Substanzen feuchtigkeitsempfindlich sind.
2. *Empfindlichkeit:* 0,2 mg D-Glucose/l oder D-Fructose/l (ΔE = 0,005; v = 2,000 ml; V = 3,020 ml / 3,040 ml)
1 mg Saccharose/l (ΔE = 0,010; v = 1,800 ml; V = 3,020 ml)
3. *Nachweisgrenze:* 0,4 mg D-Glucose/l oder D-Fructose/l (ΔE = 0,010; v = 2,000 ml; V = 3,020 ml / 3,040 ml)
2 mg Saccharose/l (ΔE = 0,020; v = 1,800 ml; V = 3,020 ml)
4. *Linearität:* von 4 µg Saccharose + D-Glucose + D-Fructose /Ansatz (v = 1,800 ml; V = 3,020 / 3,040 ml)
bis 150 µg Saccharose + D-Glucose + D-Fructose /Ansatz (v = 0,100 ml; V = 3,020 / 3,040 ml)
5. *Präzision:* ΔE = +/- 0,005 Extinktion Einheiten (D-Glucose, D-Fructose)
ΔA = +/- 0,010 Extinktion Einheiten (Saccharose)
CV = ca. 1 bis 2 % (D-Glucose, D-Fructose)
CV = ca. 1 bis 3% (Saccharose)
Fruchtsaft: r = 1,9 + 0,033 x C_{Saccharose} [g/l]
R = 3,3 + 0,061 x C_{Saccharose} [g/l]
r = 0,42 + 0,027 x C_{D-Glucose} [g/l]
R = 1,0 + 0,042 x C_{D-Glucose} [g/l]
r = 0,15 + 0,033 x C_{D-Fructose} [g/l]
R = 1,05 + 0,045 x C_{D-Fructose} [g/l]
6. *Störungen:* keine bekannt

Hinweise

- 1 Das Mitführen eines "Standards" dient ausschließlich zur Erkennung von Unregelmäßigkeiten in der Analyse. Die Messung des Standards wird nicht benötigt zur Berechnung von Ergebnissen.
- 2 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 (mit dem v berechnen).
- 3 Wiederfindung = [(ΔE_{Probe+Standard} - ΔE_{Probe}) / ΔE_{Standard}] x 100 [%]
- 4 Vor der Dosierung Enzympipetten, bzw. Spitzen der Kolbenhubpipetten mit Probe- bzw. Standardlösung mehrfach vorspülen.
- 5 z. B. mit einem Plastikspatel, oder durch Umschwenken nach Verschließen der Küvette mit Parafilm® (American Can Co., Greenwich Ct., USA).
- 6 Die Reaktion ist beendet, wenn die gemessene Extinktion konstant ist. Ist dies nicht der Fall, 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.