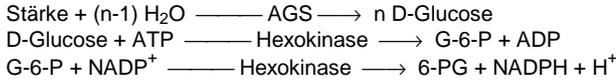


UV-Methode für ca. 32 Ansätze

Nur für den Laborgebrauch
Lagern zwischen +2 und +8°C

Die Methode ist enthalten im deutschen, holländischen und schweizerischen Lebensmittelrecht. Empfohlen z. B. von AIJN, MEBAK. Standardisiert von DIN, NEN.

Prinzip



Ref.: Beutler, H.-O. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 2-10; Verlag Chemie Weinheim, Deerfield Florida, Basel

Durchführung der Bestimmung

- Wellenlänge: 340 nm (NADPH); ε = 6,3 l x mmol⁻¹ x cm⁻¹
- Schichtdicke: 1,00 cm (Glas; Plastik)
- Temperatur: +55 bis +60°C (Inkubation)
+20 bis +25°C (Messung)
- Testvolumen: 2,320 ml
- Messung: gegen Luft oder Wasser
- Probelösung: 1,2 bis 70 µg Stärke in 0,100 bis 1,000 ml Probelösung, bzw. 0,100 bis 0,200 ml bei der Analyse von DMSO haltigen Lösungen

Reagenzien

- # AGS: Lyophilisat mit Citrat-Puffer, pH ca. 4,6, ca. 98 U Amyloglucosidase (Stabilität s. Packungsetikett). *Inhalt der Flasche # AGS mit 7 ml bidest. Wasser lösen.* Die Lösung ist 6 Wochen bei +2 bis +8°C, bzw. 3 Monate bei -15 bis -25°C haltbar.
- # 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 -5 bis -25°C haltbar.
- # 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.

Zusätzlich wird benötigt (nicht im Kit enthalten):

Standardmaterial Stärke.

Die Reagenzien zur Bestimmung von Stärke 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:	Probe-leerwert Standard ^{1,2}	Ansatz Standard ^{1,2}	Probe-leerwert Probe ^{2,3}	Ansatz Probe ^{2,3}	Reagenzien-leerwert ⁴	Probe-ansatz ⁴
Citrat-Puffer pH 4,6, AGS-Lösung # AGS	-	0,200 ml	-	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml
Probelösung⁵ (z. B. 0,03 bis 0,7 g Stärke/l)	-	-	0,100 ml	0,100 ml	-	0,100 ml
Standardlösung ⁵ (z. B. 0,7 g Stärke/l)	0,100 ml	0,100 ml	-	-	-	-
Mischen, z. B. durch vorsichtiges Schütteln der Küvette. Geschlossene Küvette bei +55 bis +60 °C 15 min inkubieren. Wieder auf Raumtemperatur bringen. Zugeben:						
Tea-Puffer pH 7,6, NADP, ATP-Lösung # 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Bidest. Wasser	1,200 ml	1,000 ml	1,200 ml	1,000 ml	1,100 ml	1,000 ml
Mischen⁶, 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
Mischen⁶, nach ca. 10 bis 15 min Extinktionen (E₂) messen. Extinktionsmessungen nach weiteren 2 min wiederholen⁷.						

Hinweise:

- 1 Das Mitführen eines "Standards" dient ausschließlich zur Erkennung von Unregelmäßigkeiten bei der Vorbereitung der Probe und der Durchführung der Messung. Die Messung des Standards wird nicht benötigt zur Berechnung von Ergebnissen.
- 2 Pipettierschema nach Lösen der Stärke mit DMSO und HCl
- 3 Dieser Ansatz zusammen mit dem Leerwert ist eine "Einzelbestimmung". Im Fall einer "Doppelbestimmung" werden 2 Ansätze mit verschiedenen Probevolumina ausgeführt. Die gemessenen ΔE müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein. Ergebnisse mit den entsprechenden Probevolumina v berechnen. (Bei der Analyse von DMSO-haltigen Lösungen beträgt das maximale Probevolumen 0,200 ml.)
- 4 Nach Vorbereitung der Probe mit HCl. (Das Probevolumen kann bis auf 1,000 ml erhöht werden. Siehe auch Hinweis 3.)
- 5 Vor der Dosierung Enzympipetten, bzw. Spitzen der Kolbenhubpipetten mit Probe- bzw. Standardlösung mehrfach vorspülen.
- 6 z. B. mit einem Plastikspatel, oder durch Umschwenken nach Verschließen der Küvette mit Parafilm® (American Can Co., USA).
- 7 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

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

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

$$c = (2,320 \times 162,1 \times \Delta E) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,5969 \times \Delta E \text{ [g Stärke / l Probelösung]}}$$

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:

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

Vorbereitung der Proben

- Stärke mit DMSO und HCl lösen:** 100 mg bis 1 g homogenisierte Probe (die ca. 70 mg Stärke enthält) in einen 100 ml Erlenmeyer Kolben genau einwiegen; 20 ml DMSO und 5 ml HCl (8 M) bei fetthaltigen Proben, bzw. 5 ml HCl (8 M) und 20 ml DMSO bei fettfreien Proben hinzufügen; Kolben schließen und im Schüttelwasserbad bei +60 °C (normalerweise) 30 bis 60 min (bei 's ehr harten' Materialien) inkubieren; auf Raumtemperatur abkühlen; ca. 50 ml bidest. Wasser hinzufügen; pH durch Zugabe von NaOH (5 M) auf 4 bis 5 (nicht höher!) einstellen; Mischung quantitativ in einen 100 ml-Messkolben überführen (mit Wasser spülen), bis zur Marke auffüllen und mischen; Messkolben einige Minuten stehen lassen und die Probelösung mit einer Kolbenhubpipette von der Oberfläche der Lösung nehmen.
- Stärke mit HCl lösen:** 100 mg bis 1 g homogenisierte Probe (die ca. 70 mg Stärke enthält) in ein Zentrifugenglas genau einwiegen; 3 x mit einer Ethanol/Wasser-Mischung (z. B. 40 %; v/v) waschen: bei Raumtemperatur ca. 20 min rühren, zentrifugieren, den Überstand abgießen; 10 ml HCl (ca. 10 %; m/m) hinzufügen, bei +60 °C in einem Wasserbad 60 min mischen; Mischung quantitativ in einen 100 ml-Becher überführen, mit bidest. Wasser spülen; pH auf 4 bis 5 (nicht höher!) durch Zugabe von NaOH (5 M) einstellen; Mischung quantitativ in einen 100 ml-Messkolben überführen (mit Wasser spülen), bis zur Marke auffüllen und mischen; Messkolben einige Minuten stehen lassen und die Probelösung mit einer Kolbenhubpipette von der Oberfläche der Lösung nehmen.
Hinweis Wasserhaltige Proben werden mit Ethanol behandelt: 10 ml Ethanol (96 %; v/v) zu ca. 1 g Probe hinzufügen, mischen und zentrifugieren; Ethanol abgießen und weiter verfahren wie oben beschrieben.
- Bestimmung von "Glucosesirup" z. B. in Fruchtsäften:** 100 mg bis 1 g homogenisierte Probe (die ca. 100 mg D-Glucose + "Glucosesirup" enthält) in einen Messkolben genau einwiegen; mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren. Bestimmung mit Probeleerwert und Probeansatz ausführen (30 min bei +20 bis +25°C inkubieren).
- Bestimmung von Dextrinen in Bier:** Probe direkt für die Bestimmung verwenden: Probeleerwert und Probeansatz.

Eigenschaften des Tests

- Spezifität:** AGS hydrolysiert α-1,4- und α-1,6-glucosidische Bindungen unabhängig vom Molekulargewicht (Amylose, Amylopectin, Glykogen, Dextrin, Maltose, Maltotriose, usw.). Eine begrenzte Differenzierung ist nur möglich durch Waschen mit Ethanol/Wasser-Mischungen im Rahmen der Vorbereitung der Probe. Bei der Analyse von reiner Stärke sind Ergebnisse von 99 % berechnet auf die Trockenmasse zu erwarten.
- Empfindlichkeit:** 3 mg Stärke/l (ΔE = 0,010; v = 0,200 ml; V = 2,320 ml)
- Nachweisgrenze:** 6 mg Stärke/l (ΔE = 0,020; v = 0,200 ml; V = 2,320 ml)
- Linearität:** von 1,2 µg Stärke/Ansatz (v = 0,200 ml; V = 2,320 ml) bis 70 µg Stärke/Ansatz (v = 0,100 ml; V = 2,320 ml)
- Präzision:** ΔE = +/- 0,10 bis 0,015 Extinktionseinheiten
VK = ca. 1 bis 2 %

Fleischwurst:	x = 1,3 g/100 g	r = 0,170 g/100 g	s(r) = +/- 0,060 g/100 g
		R = 0,217 g/100 g	s(R) = +/- 0,077 g/100 g
Kinder-Zwieback:	x = 43,5 g/100 g	r = 2,33 g/100 g	s(r) = +/- 0,82 g/100 g
		R = 8,42 g/100 g	s(R) = +/- 2,97 g/100 g
- Technische Hinweise:**
 - D-Glucose kann nicht aus dem Probeleerwert berechnet werden, da dieser auch D-Glucose aus Saccharose, Lactose und Maltose enthält, die bei der Vorbereitung der Probe mit DMSO und HCl vollständig oder teilweise hydrolysiert werden. Es ist eine eigene Vorbereitung der Probe erforderlich.
 - Enthält die Probe Maltose, dann muss die Probe mit einer Ethanol/Wasser-Mischung gewaschen werden, ansonsten werden Anteile der Maltose im Probeleerwert und der Rest im Probeansatz gefunden, da Maltose mit DMSO/HCl nur teilweise hydrolysiert wird.