

Determinazione enzimatica del Lattosio/D-Galattosio in prodotti alimentari
2 x 50 ml R1 / 2 x 12,5 ml R2 (50 test)

Solo per uso *in vitro*
Conservare tra +2 e +8 °C

Principio

Test enzimatico con β-Galattosidasi (β-Gal) e Galattosio Deidrogenasi (Gal-DH). Il NADH prodotto viene misurato a 340 nm:
Lattosio + H₂O — β-Gal —> D-Glucosio + D-Galattosio
D-Galattosio + NAD⁺ — Gal-DH —> Acido Galattonico + NADH

Reagenti

I reagenti sono pronti all'uso.

Reagente 1: due flaconi ≥ 50 ml (NAD, β-Gal)

Reagente 2: due flaconi ≥ 12,5 ml (Gal-DH)

Tutti i reagenti sono stabili fino alla fine del mese di scadenza indicato, se conservati a temperatura compresa tra 2 e 8°C. Non congelare i reagenti. Portare i reagenti a temperatura ambiente (20 - 25°C) prima dell'utilizzo.

Applicare le comuni norme di sicurezza necessarie in un laboratorio chimico. Non ingerire. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.

Questo kit può contenere sostanze pericolose. Per informazioni sul rischio delle sostanze contenute, fare riferimento alla scheda di sicurezza di questo prodotto, disponibile on line sul sito www.r-biopharm.com. Dopo l'impiego, i reattivi devono essere eliminati come rifiuti di laboratorio. Gli imballaggi possono essere riciclati.

Preparazione dei campioni

- I campioni liquidi limpidi possono essere utilizzati tal quali o dopo diluizione in un intervallo di concentrazione opportuno (vedere la sezione "Performance" del kit)
- Filtrare o centrifugare le soluzioni torbide
- Degassare i campioni contenenti anidride carbonica
- Chiarificare i campioni contenenti proteine o grassi con il reattivo di Carrez
- Macinare ed omogeneizzare i campioni solidi o semi-solidi ed estrarli in acqua. Filtrare o centrifugare, o utilizzare la chiarificazione di Carrez se necessario
- Per campioni contenenti grassi, pesare il campione in un provettone (da almeno 50 ml) ed estrarre con acqua calda; raffreddare consentendo al grasso di separarsi (ad esempio in un bagno di ghiaccio per 15 min); portare a volume con acqua, rimuovere lo strato di grasso sulla superficie e filtrare la fase acquosa prima dell'analisi

Procedura operativa

Lunghezza d'onda: 340 nm
Cammino ottico: 1 cm
Temperatura: 20 – 25 °C
Misura: contro aria o acqua
Campioni: 30 – 2000 mg/l

	Bianco reagente (BR)	Campioni
Campione / Standard	-	100 µl
Acqua distillata	100 µl	-
Reagente 1	2000 µl	2000 µl
Mescolare, incubare ca. 20 min a 20 - 25 °C. Leggere l'assorbanza A ₁ , poi aggiungere:		
Reagente 2	500 µl	500 µl
Mescolare, attendere la fine della reazione (≥ 15 min a 25°C o ≥ 40 min a 20°C), in seguito leggere l'assorbanza A ₂ .		

Il bianco reagente deve essere misurato una volta ad ogni serie, e sottratto ad ogni campione nel calcolo dei risultati.

Calcolo dei risultati

Lattosio totale

$\Delta A = (A_2 - df \times A_1)_{\text{campione}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{BR}}$
df (fattore di diluizione) = fattore di diluizione della densità ottica, calcolato sulla base dei volumi di reattivi aggiunti durante il test:

$df = (\text{campione} + R1) / (\text{campione} + R1 + R2) = 0,808.$

$c = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000)$ [g/l di Lattosio totale]
 $c = (2,600 \times 342,30 \times \Delta A) / (\epsilon \times 1 \times 0,1 \times 1000)$

Ne risulta per una determinazione a 340 nm:

$C_{\text{Lattosio totale}} [\text{g/l}] = 1,413 \times \Delta A$

Calcolo del Lattosio

Il risultato è la somma della quantità di Lattosio più quella di D-Galattosio libero nel campione. È calcolato come "Lattosio Totale" con il peso molecolare del Lattosio (342,3 g/mol). Per differenziare i due zuccheri, il Galattosio libero deve essere misurato separatamente con il test Enzytec™ Liquid D-Galattosio (E8120). Il Lattosio viene allora calcolato per differenza con il D-Galattosio libero, considerando il rapporto dei pesi molecolari:

$C_{\text{Lattosio}} [\text{g/l}] = C_{\text{Lattosio totale}} - 1,90 \times C_{\text{D-Galattosio}}$

Esempio:

Lattosio totale (E8110) 1,500 g/l
D-Galattosio (E8120) 0,400 g/l
Lattosio = 1,500 g/l - 1,90 x 0,400 g/l = 0,740 g/l

Se il rapporto D-Galattosio / Lattosio è superiore a 10:1, l'accuratezza del risultato per il Lattosio si riduce.

Performance del test

Specificità

Il test è specifico per Lattosio e D-Galattosio libero. La Gal-DH ossida D-Galattosio, ma anche L-Arabinosio al 100%. Allolattosio e Lattulosio sono riconosciuti dalla β-Galattosidasi all' 80% e al 30% rispettivamente.

Intervallo di misurazione

L'intervallo di misura raccomandato va da 50 a 2000 mg/l (Lattosio e D-Galattosio). Quando i valori superano questo range di misura, i campioni devono essere diluiti tra 100 e 2000 mg/l.

Sensibilità

Il limite inferiore di rivelazione (LoD) ed il limite di quantificazione (LoQ) sono stati determinati secondo la norma DIN 32645:2008 - 11:
- LoD = 30 mg/l (Lattosio totale)
- LoQ = 50 mg/l (Lattosio totale)

Automazione

Su richiesta sono disponibili applicazioni per sistemi automatici.

Dichiarazione liberatoria

I dati corrispondono al nostro attuale stato di tecnologia e forniscono informazioni sui nostri prodotti e sul loro uso. R-Biopharm non fornisce alcuna garanzia, esplicita o implicita, oltre a quella relativa alla qualità standard dei materiali di cui sono costituiti i suoi prodotti. Nel caso tali materiali risultassero difettosi, R-Biopharm si impegna a fornire prodotti sostitutivi. Non esiste garanzia di commerciabilità o di idoneità del prodotto per uno scopo particolare. R-Biopharm non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo del prodotto.