

UV-Test zur Bestimmung von Maltose, Saccharose und D-Glucose in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
 Test-Kombination für jeweils 25 Bestimmungen

Nur für den Laborgebrauch
 Lagerung bei 2 - 8 °C

Dieser Test enthält sämtliche Reagenzien für die differenzierte Bestimmung von Maltose, Saccharose und D-Glucose. Die Konzentrationen der drei Einzelzucker werden somit in bis zu drei separaten Küvetten ermittelt (siehe Testprinzip).

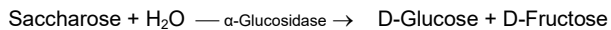
Dieser Test wurde mit den folgenden Matrices untersucht: Cerealien, Säuglingsnahrung, Backwaren, Müsliriegel, Erfrischungsgetränke, Bier und Fleisch. Detaillierte Ergebnisse und weitere Informationen zu den Validierungsdaten finden Sie im Validierungsbericht.

Andere Lebensmittel oder Probenmaterialien können getestet werden und müssen vom Anwender validiert werden.

1. Testprinzip

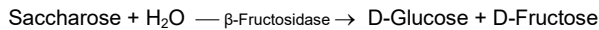
Das Ergebnis der *ersten* Küvette (Maltose-Probe) wird mit dem Molekulargewicht der Maltose (342,3 g/mol) berechnet und als Gesamtmaltose bezeichnet. Diese beinhaltet die Mengen an freier Saccharose und freier D-Glucose, die in der Probe vorhanden sein könnten.

(1) Das Enzym α -Glucosidase (Maltase) spaltet Maltose und Saccharose in zwei Moleküle D-Glucose bzw. in D-Glucose und D-Fruktose.



Zur Ermittlung der tatsächlichen Maltosekonzentration muss die Summe der Saccharose inklusive freier D-Glucose in einer *zweiten* Küvette (Saccharose-Probe) bestimmt werden, die als Gesamtsaccharose bezeichnet wird. Das Ergebnis wird mit dem Molekulargewicht der Saccharose (342,3 g/mol) ausgedrückt und zur Differenzierung von der Gesamtmaltose abgezogen.

(2) Saccharose wird durch das Enzym β -Fructosidase (Invertase) zu D-Glucose und D-Fruktose hydrolysiert:



Zur Differenzierung aller drei Zuckerarten muss darüber hinaus die freie D-Glucose (180,16 g/mol) in einer dritten Küvette getrennt bestimmt und vom Ergebnis für Gesamtsaccharose abgezogen werden. Hierbei muss das Verhältnis zwischen den Molekulargewichten der beiden Zucker berücksichtigt werden.

(3) In allen Küvetten wird D-Glucose in Gegenwart des Enzyms Hexokinase (HK) mit Adenosintriphosphat (ATP) zu D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) phosphoryliert, wobei Adenosindiphosphat (ADP) entsteht:



Des Weiteren wird in Gegenwart einer Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) entstandenes D-Glucose-6-phosphat zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert:



In jedem Fall wird Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) zu NADH reduziert. Die gebildete NADH-Menge ist proportional zur vorhandenen D-Glucose-Menge und wird jeweils bei 340 nm gemessen.

2. Reagenzien

2.1. Inhalt & Zusammensetzung

Der Test ist für eine manuelle und automatisierte Abarbeitung geeignet. Die Reagenzien reichen bei manueller Abarbeitung für jeweils 25 Bestimmungen Maltose, Saccharose und Glucose. Die Anzahl der Bestimmungen bei automatisierter Abarbeitung ist um ein Vielfaches erhöht, jedoch geräteabhängig.

- Reagenz 1: Maltose 1 x 50 ml Puffer, NAD, α -Glucosidase
- Reagenz 2: Saccharose 1 x 50 ml Puffer, NAD, β -Fructosidase
- Reagenz 3: D-Glucose 1 x 50 ml Puffer, NAD
- Reagenz 4: 1 x 37,5 ml Puffer, Hexokinase, G6P-DH

2.2. Reagenzienvorbereitung

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig und müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) gebracht werden. Komponenten nicht zwischen Kits verschiedener Chargen austauschen.

2.3. Lagerung & Haltbarkeit

Die Reagenzien sind bei sachgerechter Handhabung auch nach dem Öffnen bei 2 - 8 °C bis zum aufgedruckten Haltbarkeitsdatum stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren.

2.4. Sicherheit & Entsorgung

Das Produkt/der Test ist ausschließlich zur Anwendung im Rahmen der Zweckbestimmung geeignet. Die Gebrauchsanweisung ist strikt zu befolgen.

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Chemikalien sind zu beachten. Nicht verschlucken sowie Berührung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten sind den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu entnehmen. Nach Gebrauch können die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgt und das Verpackungsmaterial dem Recycling zugeführt werden.

3. Probenvorbereitung

3.1. Allgemein

- Die Probenvorbereitung für die manuelle und die automatisierte Testdurchführung ist identisch.
- Proben vor der Messung auf Raumtemperatur bringen.
- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen mit dest. Wasser auf eine Konzentration im Messbereich (siehe Leistungsdaten) im Test einsetzen.
- Trübe Lösungen mittels Falten- und ggf. Spritzenfilter filtrieren.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen, z.B. durch Filtrieren oder Zentrifugieren.
- Stark gefärbte und hochkonzentrierte Proben sollten mit Polyvinylpyrrolidon (PVPP) entfärbt werden.
- Proteinhaltige Proben mit Carrez-Reagenzien oder alternativ mit Perchlorsäure klären.
- Stark fetthaltige Proben in einen Messkolben einwiegen und mit heißem Wasser extrahieren; Probelösung zur Fettabscheidung abkühlen lassen (z. B. 15 min im Eisbad); Messkolben bis zur Marke mit Wasser auffüllen und vor dem Testen filtrieren.
- Feste und halbfeste Proben ausreichend homogenisieren und zerkleinern; mit Wasser extrahieren oder in dest. Wasser auflösen und ggf. filtern.

3.2. Bestimmung von Maltose in Getränken

- Getränke (u.a. Bier, Bionade, Energy Drinks) wurden in Abhängigkeit der Zuckerkonzentration direkt oder nach Verdünnen mit dest. Wasser im Test eingesetzt (Kohlensäurehaltige Getränke durch Rühren im Becherglas entgasen).

3.3. Bestimmung von Maltose in Brot, Brötchen, feinen Backwaren und Müsliriegel

- Ca. 1 g der homogenisierten Probe auf 1 mg genau in ein 50 ml Probenröhrchen einwiegen, mit 10 - 20 ml dest. Wasser versetzen und kräftig vortexen.
- Mit dest. Wasser auf 50 ml auffüllen und 30 min bei 50 °C unter gelegentlichem Schütteln extrahieren.
- Anschließend auf Raumtemperatur abkühlen lassen und mit dest. Wasser in 100 ml Messkolben überführen.
- Nacheinander 1 ml Carrez-I-Lösung (150 g/l Kaliumhexacyanoferrat) und 1 ml Carrez-II-Lösung (300 g/l Zinksulfat) zugeben und nach jeder Zugabe mischen.
- Zuletzt mit dest. Wasser auf das Endvolumen auffüllen, umschütteln und durch Faltenfilter filtrieren.

3.4. Bestimmung von Maltose in Fleisch

Die folgende Aufarbeitungsempfehlung bezieht sich auf Frikadellen als Beispiel für Fleisch- und Wurstwaren.

Aufarbeitung nach §64:

- Ca. 10 g der homogenisierten Probe auf 1 mg genau in 50 ml Falcon einwiegen, mit 20 ml dest. Wasser versetzen und kräftig vortexen.
- Mit dest. Wasser auf 50 ml auffüllen und für 15 min bei 70 °C im Wasserbad erwärmen. Anschließend 1 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure (98 %) zusetzen und mit dest. Wasser in einen 100 ml Messkolben überführen.
- Die Probe auf Raumtemperatur abkühlen lassen und mit dest. Wasser auf das Endvolumen auffüllen (Fett über der Eichmarke), vorsichtig mischen und durch Faltenfilter filtrieren.

Angepasste Aufarbeitung für stärkehaltige Proben:

- 1 - 1,5 g der homogenisierten Probe auf 1 mg genau in einen Erlenmeyer-Kolben einwiegen, mit 20 ml DMSO versetzen, kurz rühren und 5 ml 25 %-ige HCl dazugeben.
- Mit Stopfen oder Parafilm verschließen und für 60 min bei 60 °C im Wasserbad oder auf einer Heizplatte rühren.
- Im Eisbad zügig auf Raumtemperatur abkühlen und mit 0,1 M Citratpuffer pH 4,0 in 100 ml Messkolben überführen.
- 5 ml 8 M NaOH zugeben und nach erneutem Abkühlen auf Raumtemperatur mit dem Citratpuffer auf das Endvolumen auffüllen und durch Faltenfilter filtrieren.

3.5. Weitere Hinweise zur Probenvorbereitung

Verwenden Sie für jeden Probenextrakt (und die Kontrolllösungen) separate Spitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden; spülen Sie die Spitze vor dem Pipettieren mit dem Extrakt.

4. Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
 Temperatur: 20 - 37 °C (während der Messung)
 Photometer-Abgleich: gegen Luft (ohne Küvette)
 Messbereich: 10 - 1000 mg/l (Gesamt-maltose)

	Maltose		Saccharose		D-Glucose	
	RLW	Probe	RLW	Probe	RLW	Probe
Reagenz 1	2000 µl	2000 µl	-	-	-	-
Reagenz 2	-	-	2000 µl	2000 µl	-	-
Reagenz 3	-	-	-	-	2000 µl	2000 µl
Probe	-	100 µl	-	100 µl	-	100 µl
Dest. H ₂ O	100 µl	-	100 µl	-	100 µl	-
Mischen, 30 min bei 20 - 25 °C oder 20 min bei 37 °C inkubieren. Extinktion E ₁ messen, dann zugeben:						
Reagenz 4	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
Mischen, 20 min bei 20 - 25°C oder 15 min bei 37 °C inkubieren und Extinktion E ₂ messen.						

- Der Reagenzleerwert (RLW) muss bei jedem Lauf für jeden Parameter **einmalig** mitbestimmt und von jedem Probenergebnis des entsprechenden Parameters abgezogen werden.
- Reagenzleerwert und Probe müssen **im selben Lauf** und unter gleichen Bedingungen gemessen werden.
- Zur Steigerung der Sensitivität ist eine Erhöhung des Probenvolumens bis zu 1000 µl (siehe Validierungsbericht) bei **unveränderten** Reagenzvolumina möglich.
- Das Volumen des Reagenzleerwertes ist dem veränderten Probenvolumen anzupassen.
- Bei Erhöhung des Probenvolumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es dies Matrix-abhängig zu überprüfen.

4.1. Weitere Hinweise zur Testdurchführung

- Die angegebenen Inkubationszeiten können je nach vorherrschenden Laborbedingungen und abhängig von der Pipettiergenauigkeit variieren. Es wird daher empfohlen bei den ersten Durchläufen das Ende der Reaktion abzuwarten und die Zeiten ggf. anzupassen.

- Falls die Reaktion nach der angegebenen Inkubationszeit nicht zum Stillstand gekommen ist, sollten die Extinktionen in 2-min-Abständen weiter gemessen werden, bis eine konstante Extinktionszunahme pro 2 min erreicht wird. Wurden konstante Extinktionszunahmen festgestellt, so werden die Extinktionen E₂ auf die Zeit der Zugabe von Reagenz 4 (HK/G6P-DH) extrapoliert.
- Zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses sollten die gemessenen Extinktionsdifferenzen mindestens 0,02 Extinktionseinheiten betragen.
- Für die Zugabe der Reagenzien wird die Verwendung einer Multistepper-Pipette empfohlen. Verwenden Sie für jede Komponente eine separate Spitze und spülen Sie die Spitze vor dem Pipettieren mit dem jeweiligen Reagenz.
- Zur Durchmischung empfiehlt sich die Verwendung von Rührspateln für jede einzelne Küvette. Diesen erst unmittelbar vor den Extinktionsmessungen aus der Küvette nehmen.
- Ist die gemessene Extinktionsdifferenz zu klein (z. B. ΔE < 0,02), so ist das Probenvolumen (v) bis auf maximal 1000 µl zu erhöhen oder die Probelösung erneut herzustellen (höhere Einwaage oder weniger starke Verdünnung). Das Volumen der Wassermenge des Reagenzleerwertes ist in diesem Fall entsprechend anzupassen, so dass in allen das gleiche Testvolumen vorliegt. Das geänderte Probenvolumen ist in den Berechnungsformeln entsprechend einzusetzen.

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probelösungen

Es gilt die Extinktionsdifferenz ΔE für jede Probe zu berechnen:

$$\Delta E = (E_2 - df \times E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - df \times E_1)_{\text{RLW}}$$

df: Dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)
 RLW: Reagenzleerwert

$$df_{100\mu l} = \frac{\text{Probenvolumen} + R1}{\text{Testvolumen}} = 0,808$$

Der angegebene df-Wert von 0,808 gilt für eine Basisapplikation von 100 µl. **Die Erhöhung des Probenvolumens erfordert die Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors (df).**

Die Berechnung der jeweiligen Konzentrationen erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$C \text{ [g/l]} = \frac{V \times MG}{(\epsilon \times d \times v \times 1000)} \times \Delta E (\times F)$$

V: Testvolumen Basisapplikation [ml] = 2,6
 MG: Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz = 342,3
 Maltose [g/mol] = 342,3
 Saccharose [g/mol] = 180,16
 D-Glucose [g/mol] = 1,0
 d: Schichtdicke [cm] = 0,1
 v: Probenvolumen [ml] = 0,1
 ε: Extinktionskoeffizient NADH [l/mmol x cm] = 6,3 (bei 340 nm)

Wurde die Probenlösung vor der Messung verdünnt, muss das Ergebnis mit dem **Vorverdünnungsfaktor F** multipliziert werden.

5.1.1. Berechnung der Gesamt-maltose-, Gesamtsaccharose- und D-Glucosekonzentrationen

Aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergeben sich folgende Berechnungsformeln:

Küvette 1 – Gesamt-maltose:

$$C_{\text{Gesamt-maltose}} \text{ [g/l]} = \frac{(2,6 \times 342,3 \times \Delta E)}{(6,3 \times 1 \times 0,1 \times 1000 \times 2)} = 0,7063 \times \Delta E$$

Der **Faktor 2** gilt nur bei der Bestimmung von Maltose und ergibt sich aus den beiden Glukosemolekülen, die bei der Hydrolyse entstehen.

Küvette 2 – Gesamtsaccharose:

$$C_{\text{Gesamtsaccharose}} [\text{g/l}] = \frac{(2,6 \times 342,3 \times \Delta E)}{(6,3 \times 1 \times 0,1 \times 1000)} = 1,4127 \times \Delta E$$

Küvette 3 – (freie) D-Glucose:

$$C_{\text{D-Glucose}} [\text{g/l}] = \frac{(2,6 \times 180,16 \times \Delta E)}{(6,3 \times 1 \times 0,1 \times 1000)} = 0,7435 \times \Delta E$$

5.1.2. Berechnung der tatsächlichen Konzentration von Maltose

$$C_{\text{reine Maltose}} [\text{g/l}] = C_{\text{Gesamtmaltose}} - (0,5 \times C_{\text{Gesamtsaccharose}})$$

Beispiel: Enzytec™ Liquid Multi-sugar standard low E8440

Gesamtmaltose	=	1,225 g/l
Gesamtsaccharose	=	1,450 g/l
reine Maltose	=	1,225 g/l - 0,5 × 1,450 g/l = 0,500 g/l

5.1.3. Berechnung der tatsächlichen Konzentration von Saccharose

$$C_{\text{reine Saccharose}} [\text{g/l}] = C_{\text{Gesamtsaccharose}} - (1,9 \times C_{\text{D-Glucose}})$$

Der Faktor 1,9 berücksichtigt den Wassergehalt der Glucose-Einheiten.

Beispiel: Enzytec™ Liquid Multi-sugar standard low E8440

Gesamtsaccharose	=	1,450 g/l
D-Glucose	=	0,500 g/l
reine Saccharose	=	1,450 g/l - 1,9 × 0,500 g/l = 0,500 g/l

5.1.4. Berechnung der Maltosekonzentration aus den Einzelzuckerkonzentrationen

$$C_{\text{reine Maltose}} [\text{g/l}] = C_{\text{Gesamtmaltose}} - (0,5 \times C_{\text{reine Sacchar.}}) - (0,95 \times C_{\text{D-Glucose}})$$

Der Faktor 0,95 berücksichtigt den Wassergehalt der Glucose.

5.2. Berechnung bei Feststoffen

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

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

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

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

Beispiel:

$$C_{\text{Maltose}} = 0,274 \text{ g/l} \quad \text{Einwaage} = 5,02 \text{ g}/100 \text{ ml} \triangleq 50,2 \text{ g/l}$$

$$\text{Gehalt}_{\text{Maltose}} = \frac{0,274 \text{ g/l}}{50,2 \text{ g/l}} \times 100 = 0,546 \text{ g}/100 \text{ g} \text{ (oder \%)}$$

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir die Verwendung des Enzytec™ Liquid Multi-sugar standard low (E8440) mit jeweils 0,5 g/l Maltose, Saccharose und D-Glucose (siehe Beispielrechnungen im Kapitel 5.1. Berechnung bei Probelösungen).

Die Wiederfindung von Maltosekontrolllösungen sollte bei $100 \pm 5 \%$ liegen.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Die α -Glucosidase hydrolysiert α -1,4-glykosidische Bindungen in Maltose, Saccharose, Maltotriose, Maltotetraose und in Maltodextrinen, sowie in anderen Oligo-Glucosiden wie Turanose oder Maltitol. Die β -Fructosidase hydrolysiert die β -fructosidische Bindung der Saccharose.

Gegenüber Maltotriose zeigt der Test eine hohe Nebenaktivität von bis zu 92 %. Maltotetraose, -pentaose und -hexaose reagierten zu maximal 4 %. (Malto-)Dextrine reagierten zu maximal 11 %.

Stärke und Disaccharide mit β -glykosidischen Bindungen wie Lactose, Lactulose, Cellobiose und Raffinose, sowie Disaccharide mit α , α -glykosidischen Bindungen (z. B. Trehalose) und mit α -1,6-Bindungen (z. B. Isomaltose und Isomaltulose) reagieren nicht.

6.2. Interferenzen

Citronensäure und L-Ascorbinsäure zeigten bei oder unter 50 g/l keine Interferenzen. D- und L-Milchsäure zeigten bei oder unter 25 g/l keine Interferenzen, während D- und L-Äpfelsäure bei oder unter 5 g/l keine Interferenzen zeigten. Im Falle von SO₂ ist bei einer Konzentration von ca. 2 g/l eine leicht erhöhte Wiederfindung zu erwarten.

Fructose, Lactose, Lactulose, D-Mannose, Trehalose und Raffinose interferierten bis mindestens 5 g/l nicht.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Die Linearität ist bis 1000 mg/l Gesamtmaltose gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 10 und 1000 mg/l liegt.

Die untere Nachweisgrenze (LoD) und die Quantifizierungsgrenze (LoQ) wurden nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung für ein Probenvolumen von $v = 100 \mu\text{l}$ ermittelt. Hieraus ergibt sich ein LoD von 2,3 mg/l und ein LoQ von 3,9 mg/l Maltose.

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ Liquid Validierungsberichte
- Enzytec™ Liquid Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid Excel-Auswertevorlagen
- Enzytec™ Liquid Technische Informationen
- Enzytec™ Liquid Troubleshooting-Handbuch

Sicherheitsdatenblätter (SDS) und Analysenzertifikate (CoA) sind in digitaler Form unter folgendem Link erhältlich:

<https://eifu.r-biopharm.com/>



8. Grenzen dieser Methode

Die Testergebnisse können in Abhängigkeit von der Probenmatrix, der individuellen Testdurchführung und der Laborumgebung variieren. Die Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen hängen von der jeweiligen Probenmatrix und dem Extraktionsverfahren ab. Detaillierte Ergebnisse und weitere Informationen entnehmen Sie bitte dem aktuellen Validierungsbericht.

Für den vorliegenden Enzymtest konnten aufgrund der großen Anzahl von Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien nur angegebene, beispielhafte Matrices validiert werden.

Bei der Analyse einer nicht-validierten Matrix wird empfohlen, die erzielten Ergebnisse durch Dotierexperimente zu verifizieren. Falls erforderlich, muss eine geeignete Probenvorbereitung für die betreffende Probenmatrix erarbeitet und ggf. validiert werden.

9. Dienstleistungen & technischer Support

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Leistungen:

- Kundenspezifisches Troubleshooting
- Daten- & Ergebnisanalyse
- Kunden-Workshops & Webinare
- Automatisierung: applikativer Support und technischer Service

10. Haftungsausschluss

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.