

UV-Test zur Bestimmung von nativer Stärke in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
Test-Kombination für 50 Bestimmungen

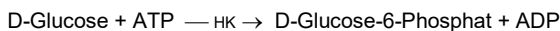
Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

1. Testprinzip

Das Enzym Amyloglucosidase (AGS) spaltet Stärke zu D-Glucose:



D-Glucose wird in Gegenwart des Enzyms Hexokinase (HK) mit ATP zu D-Glucose-6-Phosphat (G-6-P) phosphoryliert, wobei gleichzeitig ADP entsteht:



In Gegenwart einer Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) wird D-Glucose-6-Phosphat zu D-Gluconat-6-Phosphat oxidiert:



Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) wird dabei zu NADH reduziert. Die gebildete NADH-Menge ist proportional zur gebildeten D-Glucose-Menge und wird 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 50 Bestimmungen. Die Anzahl der Bestimmungen bei automatisierter Abarbeitung ist um ein Vielfaches erhöht, jedoch Geräte-abhängig.

- Reagenz 1: 2 x 50 ml mit Puffer, AGS, ATP, NAD
- Reagenz 2: 2 x 12,5 ml mit Puffer, HK, 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 Monatsende der angegebenen Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren.

2.4. Sicherheit & Entsorgung

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

- Die Probenvorbereitung für die manuelle und die automatisierte Testdurchführung ist identisch.
- Wichtig: Die Probe muss sequenziell aufgearbeitet werden. Das bedeutet, die Extraktion darf an keinem Punkt unterbrochen werden.
- 50 - 500 mg einer homogenisierten Probe (maximaler Gesamtstärkegehalt 50 mg) in einen 50 ml-Erlenmeyerkolben einwiegen.
- 5 mL HCl 32 % zugeben und 2 - 3 min rühren. Anschließend 15 mL DMSO zugeben, den Erlenmeyerkolben mit Parafilm verschließen und mindestens 60 min bei 60 °C rühren.
- Zügig auf 20 - 25 °C abkühlen, in einen 50 ml-Messkolben überführen und 5 ml 8 M NaOH hinzufügen.
- Mit 0,1 M Citratpuffer, pH 4,0, spülen und auf 50 ml auffüllen.
- Die Probeflösung vor der Bestimmung für 15 min bei 50 - 55 °C inkubieren.

4. Testdurchführung

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

Wichtig: Probe vor der Messung 15 min bei 50 - 55 °C inkubieren.		
	Reagenzleerwert	Probe / Kontrolle
Reagenz 1	2000 µl	2000 µl
Probe / Kontrolle	-	100 µl
Dest. Wasser	100 µl	-
Mischen, 10 min bei 20 - 37 °C inkubieren. Extinktion E ₁ messen, dann Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, 10 min bei 20 - 37 °C inkubieren und Extinktion E ₂ messen.		

Der Reagenzleerwert muss bei jedem Lauf einmalig mitbestimmt und von jedem Probenergebnis abgezogen werden.

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probeflösungen

5.1.1. Gesamtkonzentration Stärke

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)
RLW: Reagenzleerwert

$$df = \frac{\text{Probenvolumen} + R1}{\text{Testvolumen}} = 0,808$$

Eine Erhöhung des Probenvolumens (bis max. 1000 µl) bei unveränderten Reagenzvolamina erfordert Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors (df).

$$C_{\text{Gesamtstärke}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(E \times d \times v \times 1000)} = 0,669 \times \Delta E$$

V: Testvolumen Basisapplikation [ml] = 2,600
MG: Molekulargewicht [g/mol] = 162,14
d: Schichtdicke [cm] = 1,00
v: Probevolumen [ml] = 0,100
ε: Extinktionskoeffizient NADH [l/mmol x cm] = 6,3 (bei 340 nm)

5.1.2. Berechnung der tatsächlichen Stärkekonzentration

Das Ergebnis des Tests E8100 umfasst zusätzlich die Mengen an Maltose, D-Glucose, deren Oligomere und Derivate sowie Saccharose, die in der Probe vorhanden sein könnten.

Es wird mit dem Molekulargewicht der Stärkemonomere (162,14 g/mol) berechnet und als *Gesamtstärke* bezeichnet.

Zur Ermittlung der tatsächlichen Stärkekonzentration muss die Summe der Zucker (Maltose, D-Glucose, deren Oligomere und Derivate sowie Saccharose) mit dem Enzytec™ Liquid Maltose/Sucrose/D-Glucose Assay (E8170) bestimmt werden.

Das Ergebnis wird als *Gesamt-maltose* (342,3 g/mol) ausgedrückt und zur Differenzierung von der *Gesamtstärke* abgezogen:

$$C_{\text{Stärke}} [\text{g/l}] = C_{\text{Gesamtstärke E8100}} - 0,95 \times C_{\text{Gesamt-maltose E8170}}$$

Dabei ist darauf zu achten, dass zur Konzentrationsbestimmung der Gesamtstärke und der Gesamt-maltose die gleichen Verdünnungsfaktoren verwendet werden. Ggf. sind diese nach den individuellen Extraktionen anzupassen.

5.2. Berechnung bei Feststoffen

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir ein kommerziell erhältliches Stärkematerial mit bekannter Reinheit und Wassergehalt. Die Wiederfindung von reinen Stärkekontrolllösungen sollte bei $100 \pm 5\%$ und bei extrahierten Proben innerhalb $100 \pm 10\%$ liegen.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Die Amyloglucosidase hydrolysiert α -1,4- und α -1,6-glykosidische Bindungen. Diese kommen sowohl in Stärke (Amylose und Amylopektin) als auch in Polysacchariden wie Dextrin, Glykogen sowie in Glucosyl-Oligosacchariden vor. Maltose, Maltodextrin und Glucose weisen eine Nebenaktivität von über 90 % auf (Saccharose 52 %). Die enthaltene Hexokinase ist spezifisch für D-Glucose. Probenlösungen, die Saccharose, Maltose, freie D-Glucose und andere Oligosaccharide enthalten, müssen separat mit dem Enzytec™ Liquid Maltose/Sucrose/D-Glucose (E8170) bestimmt werden. Der erhaltene Gesamtmaltosegehalt muss vom Gesamtergebnis abgezogen werden.

6.2. Interferenzen

Schwefeldioxid und Ascorbinsäure interferieren ab einer Konzentration $> 2 \text{ g/l}$ und Zitronensäure ab einer Konzentration $> 50 \text{ g/l}$.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Linearität ist bis 1000 mg/l Gesamtstärke gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 10 und 1000 mg/l liegt. Die Nachweisgrenze (LoD) wurde 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 $3,0 \text{ mg/l}$. Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde durch ein Präzisionsprofil ermittelt und beträgt $10,0 \text{ mg/l}$. Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt $\Delta E = 0,005$. Für ein Probenvolumen von $v = 1000 \mu\text{l}$ ergibt sich ein LoD von $0,09 \text{ mg/L}$. Auf Basis von $\Delta E = 0,010$ wurde ein LoQ von $0,18 \text{ mg/L}$ errechnet.

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

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

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

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



8. Dienstleistungen & technischer Support

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Leistungen:

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

9. 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.