

UV-Test zur Bestimmung von Lactose/D-Glucose in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien  
Test-Kombination für 50 Bestimmungen

Nur für den Laborgebrauch  
Lagerung bei 2 - 8 °C

**Hinweis:** Lactosearme und lactosefreie Milch und Milchprodukte werden in der Regel unter Einsatz von  $\beta$ -Galactosidase hergestellt. Dabei entstehen aus der Lactose große Mengen D-Glucose und D-Galactose, die die Messung der verbleibenden, geringen Lactosemengen erschweren. Aus diesem Grund wird entsprechend § 64 LFGB 01.00-90 zunächst D-Glucose durch Glucoseoxidase abgebaut, um anschließend aus der restlichen Lactose freigesetzte D-Glucose präzise messen zu können.

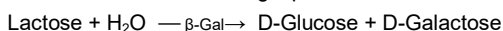
Um die Lactosefreiheit von Milchprodukten zu bestätigen, eignet sich insbesondere der vorliegende Enzytec™ Liquid Lactose/D-Glucose Test (E8130) in Kombination mit dem Enzytec™ Liquid D-Glucose Test (E8140) und dem Enzytec™ Glucose Remover (E3400).

Um Lactosekonzentrationen im Bereich des Grenzwertes von 0,01 % (10 mg/100 g) zu erfassen, muss die sensitive Testdurchführung (siehe Kapitel 4.2.) angewendet werden.

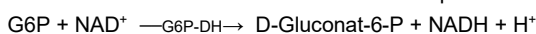
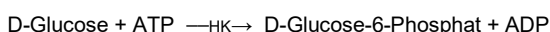
## 1. Testprinzip

Enzymatische Bestimmung mit  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal), Hexokinase (HK) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH). Die Reaktion findet in drei Schritten statt.

Lactose wird mit  $H_2O$  in Anwesenheit von  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal) zu D-Glucose + D-Galactose gespalten:



Die entstehende D-Glucose wird durch eine Hexokinase (HK) und ATP zu D-Glucose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert, welches durch Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) zu D-Glucono-6-Phosphat + Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) +  $H^+$  oxidiert wird.



NAD wird dabei zu NADH reduziert. Die gebildete NADH-Menge ist proportional zur gebildeten Menge an Lactose und freier D-Glucose 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 geräteabhängig.

- Reagenz 1: 2 x 50 ml mit Puffer, NAD,  $\beta$ -Gal, ATP
- 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.
- Die Proben sollten vor der Messung auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen mit dest. Wasser auf eine Konzentration innerhalb des Messbereichs (siehe Leistungsdaten) im Test einsetzen.
- Protein- und fetthaltige Proben mit Carrez-Reagenzien klären.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Stark gefärbte Proben gegebenenfalls entfärben.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Feste und halb feste Proben zerkleinern und homogenisieren und mit Wasser extrahieren; filtrieren oder zentrifugieren, oder bei Bedarf Carrez-Klärung anwenden.
- 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, wässrige Lösung vor dem Testen filtrieren.
- Die Probenvorbereitung in Verbindung mit dem Enzytec™ Glucose Remover (E3400) wird in der entsprechenden Testkitbeschreibung näher erläutert.

## 4. Testdurchführung

### 4.1. Allgemeine Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm  
Temperatur: 20 - 37 °C (während der Messung)  
Messung: gegen Luft (ohne Küvette) oder Wasser  
Messbereich: 45 - 3000 mg/l

	Reagenzleerwert	Probe / Kontrolle
<b>Reagenz 1</b>	2000 $\mu$ l	2000 $\mu$ l
<b>Probe / Kontrolle</b>	-	100 $\mu$ l
<b>Dest. Wasser</b>	100 $\mu$ l	-
Mischen, 20 min bei 20 - 37 °C inkubieren. Extinktion $E_1$ messen, dann Zugabe von:		
<b>Reagenz 2</b>	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l
Mischen, 15 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.

### 4.2. Sensitive Testdurchführung

Probenvorbereitung, abweichende Ergebnisberechnung und weitere Leistungsdaten sind in einer separat erhältlichen Applikation „Bestimmung von Lactose in lactosearmer und lactosefreier Milch und Milchprodukten“ (siehe Kapitel 7) detailliert beschrieben.

## 5. Berechnung der Ergebnisse

### 5.1. Berechnung bei Probelösungen

#### 5.1.1. Gesamtkonzentration Lactose

Das Ergebnis des E8130 Tests umfasst zusätzlich die Mengen an freier D-Glucose, die in der Probe vorhanden sein könnten. Die Summe Lactose/D-Glucose wird mit dem Molekulargewicht der Lactose (342,3 g/mol) berechnet und als *Gesamtlactose* bezeichnet.

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünungsfaktor)  
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). Bei Erhöhung des Volumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es dies Matrix-abhängig zu überprüfen.

$$C_{\text{Gesamtlactose}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(E \times d \times v \times 1000)} = 1,413 \times \Delta E$$

V:	Testvolumen Basisapplikation [ml]	= 2,600
MG:	Molekulargewicht [g/mol]	= 342,30
d:	Schichtdicke [cm]	= 1,00
v:	Probenvolumen [ml]	= 0,100
ε:	Extinktionskoeffizient NADH [l/mmol x cm]	= 6,3 (bei 340 nm)

### 5.1.2. Berechnung der tatsächlichen Lactose-Konzentration

Für die Differenzierung von Lactose und D-Glucose muss die freie D-Glucose mit dem Enzytec™ Liquid D-Glucose Test (E8140) bestimmt werden. Das Ergebnis wird von der Gesamtlactose abgezogen:

$$C_{\text{Lactose}} [\text{g/l}] = C_{\text{Gesamtlactose}} (\text{E8130}) - 1,9 \times C_{\text{D-Glucose}} (\text{E8140})$$

### Beispiel: Enzytec™ Liquid Multi-Sugar Standard low (E8440)

Gesamtlactose (E8130)	=	1,45 g/l
D-Glucose (E8140)	=	0,50 g/l
Lactose	=	1,45 g/l - 1,9 × 0,50 g/l = <b>0,50 g/l</b>

Bei einem Verhältnis von D-Glucose zu Lactose in der Probe größer als 10:1, ist die Präzision der Bestimmung von Lactose beeinträchtigt. Der Glucose-Überschuss muss in diesem Fall mit dem Enzytec™ Glucose Remover Kit (E3400) abgebaut werden.

### 5.2. Berechnung bei Feststoffen

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

### 5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir Enzytec™ Liquid Multi-Sugar Standard low (E8440).

Die Wiederfindung des Enzytec™ Liquid Multi-Sugar Standard low sowie anderen wässrigen Kontrolllösungen sollten innerhalb 100 ± 5 % liegen.

## 6. Leistungsdaten

### 6.1. Spezifität

Die Bestimmung ist spezifisch für Lactose und D-Glucose.

### 6.2. Interferenzen & Nebenaktivitäten

Der Test zeigt keine Interferenzen mit verschiedenen relevanten Alkoholen, Säuren, Süßungsmitteln und den meisten Zuckern. Im Falle von Sulfit gibt es keine Interferenzen bei oder unter 0,1 g/l. Oxalsäure und Glucosamin interferieren nicht bei oder unter 1 g/l. Bekannte Nebenaktivitäten: Allolactose wird zu 100 % mitbestimmt.

### 6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Die Linearität ist bis 3000 mg/l Gesamtlactose gegeben (100 µl Probenvolumen).

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung für ein Probenvolumen von v = 100 µl ermittelt. Hieraus ergibt sich ein LoD von 10 mg/l.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde mittels Präzisionsprofil ermittelt und beträgt 45 mg/l.

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt ΔE = 0,005. Für ein Probenvolumen von v = 1000 µl ergibt sich ein errechnetes LoD von 0,95 mg/l. Auf Basis von ΔE = 0,010 wurde ein LoQ von 1,9 mg/l errechnet.

## 6.4. Automatisierung mittels Pictus 500

### 6.4.1. Bestimmungsgrenze (LoQ)

P500 Applikation	LoQ
High Range	30 mg/l
Basic Range	10 mg/l
Sensitive Range	1,25 mg/l

### 6.4.2. Messbereiche

P500 Applikation	Messbereich
High Range	bis 15,000 g/l
Basic Range	bis 3100 mg/l
Sensitive Range	bis 310 mg/l

### 6.4.3. Präzision und Richtigkeit

Hier dargestellt sind Daten der Messung einer wässrigen Lösung.

#### High Range

Zielkonzentration, mg/l	1450	2000
Mittelwert, mg/l	1486	2007
SD, mg/l	26,74	22,61
RSD, %	1,80	1,13
Wiederfindung, %	103	100

#### Basic Range

Zielkonzentration, mg/l	1450	2000
Mittelwert, mg/l	1478	2028
SD, mg/l	5,11	8,39
RSD, %	0,35	0,41
Wiederfindung, %	102	101

#### Sensitive Range

Zielkonzentration, mg/l	145	200
Mittelwert, mg/l	148,0	200,9
SD, mg/l	1,29	1,22
RSD, %	0,87	0,61
Wiederfindung, %	102	100

## 7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Applikation zur sensitiven Testdurchführung (Bestimmung von Lactose in lactosearmer und lactosefreier Milch und Milchprodukten)
- 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.