

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

Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 – 8 °C

Dieser Test wurde mit ausgewählten Proben der folgenden Matrices geprüft: Obst- und Gemüsesäfte, Erfrischungsgetränke, Weine und Bier.

Detaillierte Ergebnisse und weitere Informationen zu den entsprechenden Validierungsdaten sind dem Validierungsbericht zu entnehmen.

Der Test wurde als AOAC *Official Method of Analysis* 2024.03 zugelassen. Eine Publikation ist im J. AOAC Int. 108(5), 677–691 (2025) verfügbar.

Der Test kann auch mit anderen Lebensmitteln oder Probenmaterialien verwendet werden, sofern diese einer individuellen Validierung durch den Anwender unterzogen werden.

1. Testprinzip

D-Glucose wird durch das Enzym Hexokinase (HK) und Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) zu D-Glucose-6-Phosphat (G-6-P) unter gleichzeitiger Bildung von Adenosin-5'-Diphosphat (ADP) phosphoryliert.



In Gegenwart des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) wird das gebildete Glucose-6-Phosphat durch Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) zu D-Gluconat-6-Phosphat oxidiert.



NAD wird dabei zu NADH reduziert. Die Menge an gebildetem NADH ist stöchiometrisch zur Menge an D-Glucose und wird bei 340 nm gemessen.

Der Test misst freie, nicht kovalent gebundene D-Glucose und eignet sich zur Differenzierung verschiedener Zucker bzw. zur Ermittlung der tatsächlichen Konzentration verschiedener Oligo- oder Polysaccharide, wie Maltose, Saccharose, Lactose oder Stärke.

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, 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 zur aufgedruckten Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren.

2.4. Sicherheit & Entsorgung

Der Test ist ausschließlich für den in der Zweckbestimmung beschriebenen Einsatz vorgesehen. Die Gebrauchsanweisung ist strikt zu befolgen.

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Chemikalien sind anzuwenden. Das Produkt darf nicht verschluckt werden. Berührung mit Haut und Schleimhäuten ist zu vermeiden.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten sind den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu entnehmen.

Nach Gebrauch sind die Reagenzien gemäß den geltenden Vorschriften als Laborabfall zu entsorgen. Das Verpackungsmaterial ist dem Recycling zuzuführen.

3. Probenvorbereitung

- Die Probenvorbereitung für die manuelle und die automatisierte Testdurchführung ist identisch.
- Probenlösungen vor der Messung auf Raumtemperatur bringen.
- Flüssige, klare, farblose und annähernd neutrale Probenlösungen direkt im Test einsetzen oder ausreichend verdünnen, um eine D-Glucose-Konzentration innerhalb des angegebenen Messbereichs zu erzielen (siehe Leistungsdaten).
- Bei höheren Probenvolumina (bis zu 1000 µl) den pH-Wert der Testlösung überprüfen und im Zweifelsfall neutralisieren.
- Bei trüben Proben: die Testlösung durch einen geriffelten Papier- oder Spritzenfilter filtrieren oder in einem Reaktionsröhrchen zentrifugieren (empfohlen werden 3000 U/min für mindestens 5 Minuten), bis ein klares Filtrat / ein klarer Überstand entsteht.
- Kohlendioxidhaltige Proben mittels kurzen Ultraschallimpulses (10 s) entgasen; filtrieren, wenn die Lösung nicht klar ist.
- Feste und halbfeste Proben zerkleinern und homogenisieren. Eine ausreichende Probenmenge in einen Messkolben einwiegen (Messbereich beachten) und mit Wasser extrahieren. Bis zur Marke auffüllen, durch Falten- oder Spritzenfilter filtrieren oder zentrifugieren. Bei Bedarf Carrez-Klärung anwenden.
- Protein- und fetthaltige Proben mit Carrez-Reagenzien klären: Geeignete Probenmenge in einen 100 ml Messkolben genau einwiegen und ca. 60 ml destilliertes Wasser hinzufügen. Flüssige Proben in einen 100-ml-Messkolben oder ein Becherglas pipettieren, der/das zuvor mit 60 ml destilliertem Wasser gefüllt wurde. 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g Kalium-hexacyanoferrat(II)-Trihydrat $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3 \text{H}_2\text{O}/100 \text{ ml}$) und 5 ml Carrez-II-Lösung (7,20 g Zinksulfat $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}/100 \text{ ml}$) zugeben. Nach jeder Zugabe gut mischen. Den pH-Wert mit 0,1 M NaOH auf einen Wert zwischen 7,5 und 8,5 einstellen. Die Lösung in einen 100-ml-Messkolben geben, bis zur Marke auffüllen, mischen und durch geriffelten Papierfiltern oder Spritzenfiltern filtrieren.

3.1. Säfte & Weine

- Stark saure Proben, wie Säfte und Weine, durch Zugabe von 1 M KOH auf einen pH-Wert zwischen 6,5 und 7,5 neutralisieren. Zwischendurch schütteln oder rühren; auf ein bekanntes Volumen auffüllen und ggf. mit destilliertem Wasser weiter verdünnen.
- Stark gefärbte Proben mit Polyvinylpyrrolidon (PVPP) durch Zugabe von 0,1 g PVPP zu 10 ml Saft oder Wein entfärben. Die Proben 1 Minute lang rühren oder schütteln, dann filtrieren oder mindestens 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugieren, bis ein klarer Überstand entsteht.
- Das Probenvolumen sollte erhöht werden, wenn Konzentrationen nahe dem LoQ zu erwarten sind, z. B. bei Rotwein.
- Falls erforderlich, trübe Säfte und Weine filtern; alternativ mit Carrez-Reagenzien wie oben beschrieben klären.

4. Manuelle Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
Temperatur: 20 – 37 °C
Photometer-Abgleich: gegen Luft (ohne Küvette)
Messbereich: 4 – 2000 mg/l (für 100 µl Probe)

	Reagenzleerwert	Probe / Kontrolle
Reagenz 1	2000 µl	2000 µl
Probe / Kontrolle	-	100 µl
Dest. Wasser	100 µl	-
Mischen, 3 Minuten bei 20 – 37 °C inkubieren. Extinktion E₁ messen , dann Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, 15 Minuten bei 20 – 37 °C inkubieren und Extinktion E₂ messen .		

4.1. Wichtige Hinweise zur Testdurchführung

- Der Reagenzleerwert (Wasserprobe) **muss in jeder Messserie** mitbestimmt und von **jedem** Probenergebnis abgezogen werden.
- Die angegebenen Inkubationszeiten wurden bei 25 °C validiert und festgelegt. Die Durchführung des Tests ist grundsätzlich auch im Temperaturbereich von **20 – 37 °C** möglich.
- Verwenden Sie für jeden Probenextrakt und die Kontrolllösungen separate Spitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden; spülen Sie die Spitze vor dem Pipettieren.
- Für die Zugabe der Reagenzien wird die Verwendung einer Multistepper-Pipette empfohlen. Verwenden Sie für jede Komponente eine separate Spitze.
- Zur Durchmischung empfiehlt sich die Verwendung von Rührspateln für jede einzelne Küvette. Diese erst unmittelbar vor den Extinktionsmessungen aus der Küvette nehmen.
- Das Ende der Reaktion bzw. ein Stillstand der Extinktionen sollte (zumindest bei den ersten Testdurchläufen bzw. der Validierung) stets abgewartet werden. Ist die Extinktion nach der empfohlenen Inkubationszeit nicht zum Stillstand gekommen, sollte weiter in bspw. 5-min-Abständen gemessen werden, bis ein konstanter Extinktionswert erreicht ist.
- Sollte eine Schleichreaktion auftreten, ist die Reaktion nach den angegebenen Inkubationszeiten noch nicht abgeschlossen und zeigt in der Regel einen konstanten Anstieg von ΔE . Berechnen Sie den analyt-spezifischen ΔE -Wert, indem Sie die Absorptionswerte gegen die Zeit auftragen und eine lineare Regression durchführen, um die Anstiegsrate von ΔE pro Minute in Relation zur Schleichreaktion zu bestimmen. Extrapolieren Sie dann die Absorption auf den Zeitpunkt der Reagenz-2-Zugabe.
- Ist die gemessene Extinktionsdifferenz der Proben zu klein ($< 0,020$), so ist die Probelösung mit höherer Einwaage oder weniger starker Verdünnung erneut herzustellen.
- Ist die Extinktionsdifferenz der Proben sehr groß (bspw. $> 1,500$), so ist die Probelösung gegebenenfalls zu verdünnen.

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung der D-Glucose-Konzentration

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

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

Der angegebene df-Wert von **0,808** gilt für eine Basisapplikation von **100 µl**. Eine Erhöhung des Probenvolumens ist möglich (max. 1000 µl; siehe Validierungsbericht). Bei gleichbleibenden Reagenzvolumina erfordert dies die Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors (df).

Bei Erhöhung des Probenvolumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es, dies matrix-abhängig zu überprüfen. Der Reagenzleerwert ist dem veränderten Probenvolumen anzupassen.

Die Berechnung der D-Glucose-Konzentration erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$C_{\text{D-Glucose}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(E \times d \times v \times 1000)} = 0,744 \times \Delta E \times F$$

Wurde der Probenextrakt vor der Messung verdünnt, muss dieses Ergebnis mit dem Vorverdünnungsfaktor F multipliziert werden.

V:	Testvolumen Basisapplikation [ml]	= 2,600
MG:	Molekulargewicht D-Glucose [g/mol]	= 180,16
d:	Schichtdicke [cm]	= 1,00
v:	Probenvolumen [ml]	= 0,100
ε:	Extinktionskoeffizient NADH [l/(mmol × cm)]	= 6,3 (bei 340 nm)

5.2. Berechnung des D-Glucose-Gehalts in Feststoffen

Bei der Analyse fester und halbfester Proben, die für die Extraktion der Probe eingewogen werden müssen, wird der Gehalt auf die Einwaage bezogen:

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir den Enzytec™ Liquid Multi-Sugar Standard low (Art. Nr. E8440; 0,50 g/l D-Glucose).

Die Wiederfindung des Multi-Standards low sowie anderen wässrigen Kontrolllösungen sollte bei $100 \pm 5 \%$ liegen.

Als zertifiziertes Referenzmaterial empfehlen wir unter anderem:

- NIST Standard Referenzmaterial 3282, Low Calorie Cranberry Juice Cocktail (Referenzwert: D-Glucose 8,50 g/l $\pm$ 0,6 g/l, $k=2$)
- Standardwein der Deutschen Weinanalytiker (Lot 1050807, Referenzwert: D-Glucose 29,57 g/l)
<https://www.weinanalytiker.de/standard-testloesung/>

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Der Test ist spezifisch für D-Glucose und zeigte keine relevanten Nebenaktivitäten bei den untersuchten Substanzen.

Maltose führte erst bei einer getesteten Konzentration von 50 g/l zu einer erhöhten Wiederfindung, was sich durch Spuren von D-Glucose in der Substanz erklären lässt. Oligofruktose und Trehalose (je 10 g/l) führten in Gegenwart von 0,25 g/l D-Glucose zu einer leicht höheren Wiederfindung.

6.2. Interferenzen

Verwandte Zucker und Zuckeralkohole wie D-Sorbitol, D-Mannitol, D-Galactose und Lactose (je 50 g/l) zeigten keine Interferenzen in Gegenwart von 0,376 g/l D-Glucose. Psicose und Tagatose (je 5 g/l) zeigten keine Interferenzen in Gegenwart von 0,5 g/l D-Glucose. D-Mannose und D-Fructose interferieren ab einer getesteten Konzentration von 5,1 g/l, respektive 12,5 g/l.

Die folgenden Säuren wurden in Gegenwart von 0,5 g/l D-Glucose auf ihre Interferenzen getestet: Ascorbinsäure (5 g/l), L-Weinsäure, D- und L-Milchsäure, Essigsäure, Zitronensäure (je 25 g/l) und D-/L-Apfelsäure (50 g/l) zeigten keine Interferenzen. Im Falle von Sulfid wurden keine Interferenzen bei oder unter einer Konzentration von 1,25 g/l festgestellt. Glycerin zeigte keine Interferenzen bei 25 g/l.

Zahlreiche Süßstoffe wurden mit je 10 g/l auf ihre Interferenzen in Gegenwart von 0,25 g/l D-Glucose untersucht: Acesulfam, Adventam, Aspartam, Cyclamat, Neohesperidin, Neotam, Saccharin, Sucralose, Thaumatin und Alitum zeigten keine interferierende Wirkung bei der Bestimmung von D-Glucose.

Mehrere Zuckerersatzstoffe (nährstoffhaltige Süßstoffe) wurden mit je 10 g/l auf ihre Interferenzen in Gegenwart von 0,25 g/l D-Glucose getestet: Sorbit, Mannit, Isomalt, Maltit, Lactit, Xylit, Erythrit, Inulin und Isomaltulose zeigten keine Interferenzen.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Linearität ist bis 2000 mg/l D-Glucose gegeben (100 µl Probe). Der empfohlene Messbereich beträgt 4 – 2000 mg/l.

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung ermittelt. Bei einem Probenvolumen von 100 µl beträgt die berechnete LoD 1,4 mg/l.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde mittels Präzisionsprofil ermittelt und beträgt 4 mg/l bei einem Probenvolumen von 100 µl.

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt $\Delta E = 0,005$. Für ein Probenvolumen von $v = 1000 \mu\text{l}$ ergibt sich eine errechnete LoD von 0,5 mg/l. Auf Basis von $\Delta E = 0,010$ wurde eine LoQ von 1,0 mg/l errechnet.

6.4. Automatisierung mittels Pictus 500

6.4.1. Bestimmungsgrenze (LoQ)

P500 Applikation	LoQ
High Range	75 mg/l
Basic Range	18 mg/l
Sensitive Range	2,4 mg/l

6.4.2. Messbereiche

P500 Applikation	Messbereich
High Range	bis 10 g/l
Basic Range	bis 1900 mg/l
Sensitive Range	bis 190 mg/l

6.4.3. Präzision und Richtigkeit

Hier dargestellt sind Daten der Messung einer wässrigen Lösung:

High Range

Zielkonzentration, mg/l	500	1400
Mittelwert, mg/l	506,3	1383,8
SD, mg/l	12,62	25,22
RSD, %	2,49	1,82
Wiederfindung, %	101	98,8

Basic Range

Zielkonzentration, mg/l	500	1400
Mittelwert, mg/l	501,7	1385,2
SD, mg/l	0,88	5,96
RSD, %	0,18	0,43
Wiederfindung, %	100	98,9

Sensitive Range

Zielkonzentration, mg/l	50	140
Mittelwert, mg/l	51,5	140,7
SD, mg/l	0,71	0,42
RSD, %	1,39	0,30
Wiederfindung, %	103	101

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ Liquid D-Glucose Validierungsbericht
- Enzytec™ Liquid Allgemeines Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid D-Glucose Excel-Auswertevorlage
- Enzytec™ Liquid D-Glucose Technical Information
- Enzytec™ Liquid Troubleshooting-Handbuch

Sicherheitsdatenblätter (SDS) und Analysenzertifikate (CoA) sind in digitaler Form und unter Angabe der Chargennummer über folgenden Link erhältlich:

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



8. Grenzen dieser Methode

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

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

Bei der Analyse einer nicht-validierten Matrix wird empfohlen, die erzielten Ergebnisse durch Dotierexperimente zu überprüfen. Falls erforderlich, ist eine geeignete Probenvorbereitung für die betreffende Probenmatrix zu entwickeln und ggf. zu validieren.

Die Verantwortung für die Validierung nicht geprüfter Matrices sowie für die Sicherstellung der Eignung des Tests für den vorgesehenen Zweck liegt ausschließlich beim Anwender.

9. Dienstleistungen & technischer Support

Auf Anfrage bieten wir Ihnen u.a. folgende Dienstleistungen:

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

10. Haftungsausschluss

Diese Angaben entsprechen dem aktuellen Stand unserer Kenntnisse und dienen ausschließlich der Information über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten. Sie stellen keine Zusicherung bestimmter Eigenschaften oder deren Eignung für einen konkreten Verwendungszweck dar.

R-Biopharm AG leistet für Sach- und Rechtsmängel über einen Zeitraum von 12 Monaten (bzw. im Falle von Produkten, die eine kürzere Haltbarkeit haben, bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums oder bei limitierter Verwendung bis zum Erreichen der Anzahl der Verwendungen) Gewähr, gerechnet vom Tag des Gefährübergangs, vorbehaltlich einer frist- und formgerechten Rüge durch den Kunden, wobei die vereinbarte Beschaffenheit und Eignung für die vertraglich vorausgesetzte Verwendung und Übergabe mit vereinbartem Zubehör und vereinbarten Anleitungen („subjektiven Anforderungen“) entscheiden, ob eine Sache mangelhaft ist.

Die R-Biopharm AG übernimmt keine Gewährleistung für Folgen aus der Versäumnis

- Die Gebrauchs- oder Sicherheitsanweisungen eines Produktes zu lesen, zu verstehen oder zu befolgen;
- geschultes und qualifiziertes Personal für das Produkt einzusetzen;
- geeignete Industriestandards- und Praktiken anzuwenden, insbesondere Good Laboratory Practices;
- für das Produkt geeignete Kontroll-/Proben-/Probenmatrices oder Abarbeitungsverfahren/Prozesse einzusetzen und dies, soweit erforderlich, zu überprüfen;
- sonstige fehlerhafte Benutzung;
- Veränderung oder Bearbeitungen der Produkte
- unsachgemäße Lagerung durch den Kunden oder Dritte
- Folgen chemischer, elektromagnetischer, mechanischer oder elektrolytischer Einflüsse außerhalb der von R-Biopharm AG dokumentierten Standardbereiche
- Schäden und Störungen, die durch von R-Biopharm nicht zu vertretende äußere Einwirkungen entstanden sind (z.B. Einbruch, Diebstahl, Blitzschlag, Feuer, Wasser, höhere Gewalt).

R-Biopharm AG haftet für Arglist, grobe Fahrlässigkeit oder Vorsatz der R-Biopharm AG, Verletzung von Leib, Leben oder Gesundheit, der Übernahme einer Garantie, eines Beschaffungsrisikos nach § 276 BGB oder einer Haftung nach einem anderen gesetzlich zwingenden Haftungstatbestand.

Die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung wesentlicher Vertragspflichten (Pflichten, die für die Erreichung des Vertragszwecks wesentlich sind und auf deren Einhaltung der Vertragspartner regelmäßig vertrauen darf) ist auf den vertragstypisch vorhersehbaren Schaden begrenzt; die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung anderer Pflichtverletzungen ist ausgeschlossen.

ALLE WEITEREN AUSDRÜCKLICHEN ODER STILL-SCHWEIGENDEN GEWÄHRLEISTUNGEN ODER GARANTIEEN JEDLICHER ART SIND AUSGESCHLOSSEN, UNABHÄNGIG DAVON, OB SIE SICH AUS GEPFLOGENHEITEN, GESCHÄFTS-PRAKTIKEN, DEM GESCHÄFTSVERLAUF ZWISCHEN DEN PARTEIEN ODER ANDEREN UMSTÄNDEN ERGEBEN.

Die R-Biopharm AG übernimmt keine Haftung für Folgeschäden, insbesondere entgangenen Gewinn, Produktionsrückstände oder sonstige mittelbare Schäden.