

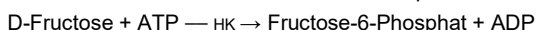
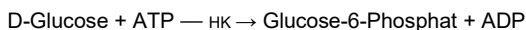
UV-Test zur Bestimmung von D-Glucose/D-Fructose in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
Test-Kombination für 50 Bestimmungen

Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

1. Testprinzip

Enzymatische Bestimmung mit Hexokinase (HK), Phosphoglucose-Isomerase (PGI) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH).

D-Glucose bzw. D-Fructose werden, unter gleichzeitiger Bildung von ADP, durch die Enzyme Hexokinase (HK) und ATP zu Glucose-6-Phosphat (G6P) bzw. Fructose-6-Phosphat (F6P) phosphoryliert.



In Anwesenheit des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) wird G6P durch Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺), unter Bildung von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH), zu Gluconat-6-Phosphat oxidiert.

Durch Zugabe von Phosphoglucose-Isomerase (PGI) wird Fructose-6-Phosphat (F6P) in Glucose-6-Phosphat (G6P) umgewandelt, das wiederum in Gluconat-6-Phosphat und NADH umgewandelt wird.



Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) wird dabei zu NADH reduziert. Die gebildete NADH-Menge ist proportional zur gebildeten D-Glucose-/D-Fructose-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 geräteabhängig.

- Reagenz 1: 2 x 50 ml mit Puffer, NAD
- Reagenz 2: 2 x 12,5 ml mit Puffer, HK, G6P-DH
- Reagenz 3: 2 x 12,5 ml mit Puffer, PGI

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.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Stark gefärbte Proben gegebenenfalls entfärben.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Protein- und fetthaltige Proben mit Carrez-Reagenzien klären.

- 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.

4. Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
Temperatur: 20 - 37 °C (während der Messung)
Messung: gegen Luft (ohne Küvette) oder Wasser
Messbereich: 7 - 2000 mg/l für D-Glucose
6 - 1000 mg/l für D-Fructose

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

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

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probelösungen

5.1.1. Gesamtkonzentration D-Glucose

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

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 Reagenzvolumina erfordert Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors (df). Bei Erhöhung des Volumens stark saurer Proben, kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Dies gilt es zu überprüfen.

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

V: Testvolumen Basisapplikation [ml] = 2,600
MG: Molekulargewicht [g/mol] = 180,16
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. Gesamtkonzentration D-Fructose

$$\Delta E = (E_3 - df \times E_2)_{Probe} - (E_3 - df \times E_2)_{RLW}$$

df: Dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)
RLW: Reagenzleerwert

$$df = \frac{\text{Probenvolumen} + R1 + R2}{\text{Testvolumen}} = 0,839$$

Eine Erhöhung des Probenvolumens (bis max. 1000 µl) bei unveränderten Reagenzvolumina erfordert Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors (df). Bei Erhöhung des Volumens stark saurer Proben, kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Dies gilt es zu überprüfen.

$$C_{\text{Gesamt-D-Fructose}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(\epsilon \times d \times v \times 1000)} = 0,887 \times \Delta E$$

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

5.1.3. D-Glucose und D-Fructose ohne Differenzierung

Reagenz 2 und Reagenz 3 unmittelbar nacheinander pipettieren und nur einmal inkubieren.

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)
RLW: Reagenzleerwert

$$df = \frac{\text{Probenvolumen} + R1}{\text{Testvolumen}} = 0,677$$

Eine Erhöhung des Probenvolumens (bis max. 1000 µl) bei unveränderten Reagenzvolumina erfordert Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors (df). Bei Erhöhung des Volumens stark saurer Proben, kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Dies gilt es zu überprüfen.

$$C_{\text{Gesamt-D-Glucose/D-Fructose}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(\epsilon \times d \times v \times 1000)} = 0,887 \times \Delta E$$

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

5.2. Berechnung bei Feststoffen

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

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

Die Wiederfindung des Enzytec™ Liquid Multi-Sugar Standard low sowie anderen wässrigen Kontrolllösungen sollten innerhalb 100 ± 5 % und bei extrahierten Lebensmittelproben innerhalb 100 ± 10 % liegen.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität

Die Bestimmung ist spezifisch für D-Glucose und D-Fructose.

6.2. Interferenzen & Nebenaktivitäten

Insgesamt wurden über 35 verschiedene Substanzen aus den folgenden drei Kategorien auf Interferenzen getestet: verwandte Zucker, wichtige Säuren, Glycerin und Sulfit, Süßstoffe und Zuckeraustauschstoffe. Im Falle von Mannose gibt es keine Interferenzen bei unter 5,1 g/l. Sulfit interferiert ab einer Konzentration von 1,25 g/l.

Der Enzytec™ Liquid D-Glucose/D-Fructose Assay zeigt keine Nebenaktivität gegenüber relevanten Zuckern oder Zuckeralkoholen.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Die Linearität ist bis 2000 mg/l für D-Glucose gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 7 und 2000 mg/l (100 µl Probenvolumen) liegt.

Die Linearität ist bis 1000 mg/l für D-Fructose gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 6 und 1000 mg/l (100 µl Probenvolumen) liegt.

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepuffert wässriger Lösung für ein Probenvolumen von v = 100 µl ermittelt. Hieraus ergibt sich ein LoD von 2,3 mg/l für D-Glucose und 2,1 mg/l für D-Fructose. Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde mittels Präzisionsprofil ermittelt und beträgt 6,1 mg/l für D-Glucose und 5,6 mg/l für D-Fructose.

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 0,5 mg/l für D-Glucose und 0,57 mg/l für D-Fructose. Auf Basis von ΔE = 0,010 wurde ein LoQ von 1 mg/l für D-Glucose und 1,14 mg/l für D-Fructose errechnet.

6.4. Automatisierung mittels Pictus 500

Proben, die freie D-Glucose enthalten, müssen bei der automatisierten Abarbeitung in der Regel separat mit dem Enzytec™ Liquid D-Glucose Test (E8140) bestimmt werden. Der erhaltene D-Glucose-Gehalt (E8140) muss vom Gesamtergebnis (E8160) abgezogen werden. Dies liegt daran, dass Analyser (bis auf wenige Ausnahmen) generell nur zwei Messpunkte hat. Eine Differenzierung in einer Küvette ist somit nicht möglich.

6.4.1. Bestimmungsgrenze (LoQ)

Die hier dargestellten Messwerte zeigen die Summe aus D-Glucose und D-Fructose.

P500 Applikation	LoQ
High Range	75 mg/l
Basic Range	12 mg/l
Sensitive Range	5 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	1400	1000
Mittelwert, mg/l	1402	1020
SD, mg/l	8,49	13,11
RSD, %	0,61	1,28
Wiederfindung, %	100	102

Basic Range

Zielkonzentration, mg/l	1400	1000
Mittelwert, mg/l	1402	1016
SD, mg/l	7,08	6,93
RSD, %	0,50	0,68
Wiederfindung, %	100	102

Sensitive Range

Zielkonzentration, mg/l	140	100
Mittelwert, mg/l	140	102
SD, mg/l	0,63	0,75
RSD, %	0,45	0,74
Wiederfindung, %	100	102

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.