

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

Nur für den Laborgebrauch  
Lagerung bei 2 - 8 °C

## 1. Testprinzip

Das Enzym α-Glucosidase (Maltase) spaltet Maltose und Saccharose in zwei Moleküle D-Glucose bzw. in D-Glucose und D-Fructose. Des Weiteren wird Saccharose durch das Enzym β-Fruktosidase (Invertase) ebenfalls zu D-Glucose und D-Fructose hydrolysiert:



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. Das Ergebnis wird als Gesamtmaltose [g/l] ausgedrückt.

## 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, Maltase, Invertase, 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 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

- 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.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Feste oder halb feste Proben zerkleinern und homogenisieren, geeignete Probemenge einwiegen und mit Wasser extrahieren. Ggf. zentrifugieren, filtrieren oder Carrèz-Klärung durchführen.
- 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  
Proben: 10 - 1100 mg/l

	Reagenzleerwert	Probe / Kontrolle
<b>Reagenz 1</b>	2000 µl	2000 µl
<b>Probe / Kontrolle</b>	-	100 µl
<b>Dest. Wasser</b>	100 µl	-
Mischen, etwa 30 min bei 20 °C, 20 min bei 25 °C oder 15 min bei 37 °C inkubieren. Extinktion E <sub>1</sub> messen, dann zugeben:		
<b>Reagenz 2</b>	500 µl	500 µl
Mischen, etwa 5 min bei 20 - 37 °C inkubieren und Extinktion E <sub>2</sub> messen.		

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

Zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses sollten die gemessenen Extinktionsdifferenzen üblicherweise mindestens 0,100 Extinktionseinheiten betragen.

## 5. Berechnung der Ergebnisse

### 5.1. Berechnung bei Probelösungen

#### 5.1.1. Gesamtkonzentration Maltose/Saccharose/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

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

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

$$C_{\text{Gesamtmaltose}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times \text{MG} \times \Delta E)}{(\epsilon \times d \times v \times 1000 \times 2)} = 0,7063 \times \Delta E$$

Der Faktor 2 ergibt sich aus den beiden Glukosemolekülen, die bei der Hydrolyse von Maltose entstehen. Probenverdünnungsfaktor bei der Berechnung berücksichtigen.

V:	Testvolumen Basisapplikation [ml]	= 2,600
MG:	Molekulargewicht [g/mol]	= 342,3
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 Maltosekonzentration nach Abzug von Saccharose/D-Glucose

Das Ergebnis des Tests E8170 umfasst zusätzlich die Mengen an freier Saccharose und freier D-Glucose, die in der Probe vorhanden sein könnten.

Es wird mit dem Molekulargewicht der Maltose (342,3 g/mol) berechnet und als *Gesamtmaltose* bezeichnet.

Zur Ermittlung der tatsächlichen Maltosekonzentration muss die Summe der Saccharose inklusive freier D-Glucose mit dem Enzytec™ Liquid Sucrose/D-Glucose Assay (E8180) bestimmt werden. Das Ergebnis wird als *Gesamtsaccharose* (342,3 g/mol) ausgedrückt und zur Differenzierung von der Gesamtmaltose abgezogen:

$$C_{\text{Maltose}} [\text{g/l}] = C_{\text{Gesamtmaltose E8170}} - 0,5 \times C_{\text{Gesamtsaccharose E8180}}$$

#### Beispiel: Enzytec™ Liquid Multi-sugar standard low E8440

Gesamtmaltose (E8170)	=	1,225 g/l
Gesamtsaccharose (E8180)	=	1,450 g/l
Maltose	=	1,225 g/l - 0,5 × 1,450 g/l = 0,500 g/l

## 5.1.3. Berechnung der tatsächlichen Maltosekonzentration nach Differenzierung von Saccharose und D-Glucose

### 5.1.3.1. Differenzierung von Saccharose und D-Glucose

Sollte die Differenzierung aller drei Zuckerarten gewünscht sein, muss darüber hinaus die freie D-Glucose mit dem Test Enzytec™ Liquid D-Glucose (E8140) getrennt bestimmt und vom Ergebnis des Tests Enzytec™ Liquid Sucrose/D-Glucose (E8180) abgezogen werden. Hierbei muss das Verhältnis zwischen den Molekulargewichten der beiden Zucker berücksichtigt werden ( $MG_{\text{Saccharose}} = 342,3 \text{ g/mol}$ ,  $MG_{\text{Glucose}} = 180,16 \text{ g/mol}$ ).

Für weitere Hinweise bitte die entsprechenden Packungsbeilagen für D-Glucose (E8140) und Saccharose/D-Glucose (E8180) beachten.

$$C_{\text{Saccharose}} [\text{g/l}] = C_{\text{Gesamtsaccharose E8180}} - 1,9 \times C_{\text{Glucose E8140}}$$

#### Beispiel: Enzytec™ Liquid Multi-sugar standard low E8440

Gesamtsaccharose (E8180)	=	1,450 g/l
D-Glucose (E8140)	=	0,500 g/l
Saccharose	=	$1,450 \text{ g/l} - 1,9 \times 0,500 \text{ g/l}$
	=	<b>0,500 g/l</b>

### 5.1.3.2. Berechnung der Maltosekonzentration

Für diese Berechnung wird vom Gesamtmaltosewert der Glucoseanteil aus dem berechneten tatsächlichen Saccharosewert (D-Glucose + D-Fructose) und dem gemessenen, um den Wassergehalt (0,95) bereinigten Glucosewert abgezogen.

$$C_{\text{Maltose}} [\text{g/l}] = C_{\text{Gesamtmaltose E8170}} - (C_{\text{Sacch. E8180}} \div 2) - (C_{\text{Gluc. E8140}} \times 0,95)$$

#### Beispiel: Enzytec™ Liquid Multi-sugar standard low E8440

Gesamtmaltose (E8170)	=	1,225 g/l
Saccharose (E8180)	=	$0,500 \text{ g/l} \div 2$
D-Glucose (E8140)	=	$0,500 \text{ g/l} \times 0,95$
Maltose	=	$1,225 \text{ g/l} - (0,500 \text{ g/l} \div 2) - (0,500 \text{ g/l} \times 0,95)$
	=	<b>0,500 g/l</b>

## 5.2. Berechnung bei Feststoffen

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

## 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.

Die Wiederfindung von Maltosekontrolllösungen sollte bei  $100 \pm 5 \%$  und bei extrahierten Proben innerhalb  $100 \pm 10 \%$  liegen.

## 6. Leistungsdaten

### 6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

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

Gegenüber Maltotriose zeigt der Test eine hohe Nebenaktivität von 92 %. Maltotetraose reagierte zu 24 % und Maltodextrin zu 40 %.

Demzufolge ist es nicht möglich zu unterscheiden, ob Maltose, Saccharose, D-Glucose oder andere Oligosaccharide mit  $\alpha$ -1,4-glykosidischer oder  $\beta$ -fructosidischer Bindung in einer Probe enthalten sind. Zur Differenzierung muss stets ein Paralleltest auf Saccharose und ggf. Glucose durchgeführt werden (siehe Berechnung der Ergebnisse). Stärke und Disaccharide mit  $\beta$ -glykosidischen Bindungen wie Lactose, Lactulose, Cellobiose und Raffinose sowie Disaccharide mit  $\alpha$ , $\alpha$ -glykosidischen Bindungen wie Trehalose und mit  $\alpha$ -1,6-Bindungen wie Isomaltose und Isomaltulose reagieren nicht.

In Anwesenheit von Saccharose und D-Fructose kann es zu einer Schleimreaktion kommen, wenn die zweite Inkubationszeit von 5 Minuten überschritten wird.

## 6.2. Interferenzen

Citronensäure und Ascorbinsäure zeigten bei oder unter 50 g/l keine Interferenzen. Im Falle von  $\text{SO}_2$  ist bei einer Konzentration von ca. 2 g/l eine leicht erhöhte Wiederfindung zu erwarten.

Bei D-Mannose wurde eine starke Interferenz bei einem Gehalt von mehr als 7,5 g/l beobachtet.

## 6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Linearität ist bis 1300 mg/l Maltose gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 10 und 1100 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 5 mg/l und ein LoQ von 10 mg/l Maltose.

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 0,5 mg/l. Auf Basis von  $\Delta E = 0,010$  wurde ein LoQ von 1,0 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 erhältlich auf der Website <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.