

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

Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

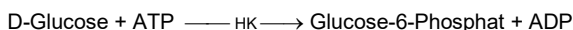
1. Testprinzip

Die enzymatische Reaktion erfordert drei Enzyme (β -Fructosidase, Hexokinase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) und ein Co-Enzym (NAD). Die Reaktion läuft in vier Schritten ab:

Saccharose wird mit H_2O durch die Anwesenheit von β -Fructosidase zu D-Glucose + D-Fructose hydrolysiert:



Die entstehende D-Glucose wird in Gegenwart von ATP und einer Hexokinase (HK) zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert:



Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) oxidiert das gebildete Glucose-6-Phosphat mit NAD^+ zu Gluconat-6-Phosphat + $NADH + H^+$:



Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) wird dabei zu NADH reduziert. Die gebildete NADH-Menge ist proportional zu der umgesetzten Menge an Saccharose 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 Geräte-abhängig.

- Reagenz 1: 2 x 50 ml mit Puffer, NAD, β -Fructosidase, 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.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Stark gefärbte Proben gegebenenfalls entfärben.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.

- Stark fetthaltige Proben in einen Messkolben einwiegen und mit heißem Wasser extrahieren; Probelösung zur Fettabcheidung abkühlen lassen (z. B. 15 min im Eisbad); Messkolben bis zur Marke mit Wasser auffüllen, wässrige Lösung vor dem Testen filtrieren.
- 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 saure Proben ggf. mit KOH / NaOH bzw. oder stark alkalische Proben ggf. mit HCl auf pH 7 einstellen.

4. Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
Temperatur: 20 - 37 °C (während der Messung)
Messung: gegen Luft (ohne Küvette) oder Wasser
Messbereich: 10 - 2500 mg/l

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

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probelösungen

5.1.1. Gesamtkonzentration Saccharose (Saccharose und 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 μ l) bei unveränderten Reagenzvolümina erfordert Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors (df). Bei Erhöhung des Volumens stark saurer Proben, kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Dies gilt es zu überprüfen.

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

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 Saccharosekonzentration nach Differenzierung von Saccharose und D-Glucose

5.1.2.1. Differenzierung von Saccharose und D-Glucose

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

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

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

Beispiel: Enzytec™ Liquid Multi-Sugar Standard low E8440

Gesamtsaccharose (E8180)	=	1,500 g/l
D-Glucose (E8140)	=	0,400 g/l
Saccharose	=	1,500 g/l - 1,9 × 0,400 g/l = 0,740 g/l

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

5.2. Berechnung bei Feststoffen

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

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 $100 \pm 5 \%$ und bei extrahierten Lebensmittelproben innerhalb $100 \pm 10 \%$ liegen.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Die Bestimmung ist spezifisch für Saccharose und D-Glucose. Oligosaccharide des Raffinose Typs werden auch hydrolysiert, jedoch sehr viel langsamer. Der Enzytec™ Liquid Sucrose/D-Glucose Assay zeigt eine leichte Nebenaktivität gegenüber Oligosacchariden des Raffinose-Typs, z. B. L-Raffinose.

Probenlösungen, die freie D-Glucose enthalten, müssen separat mit dem Enzytec™ Liquid D-Glucose (E8140) Test bestimmt werden. Der erhaltene Zuckergehalt muss vom Gesamtergebnis abgezogen werden.

6.2. Interferenzen

Der Test zeigt keine Interferenzen mit verschiedenen relevanten Alkoholen, Säuren, Süßungsmitteln und den meisten Zuckern. Im Falle von Sulfid wird eine Verdünnung in dest. Wasser $\leq 0,5 \text{ g/l}$ empfohlen.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Die Linearität ist bei 2 bis 3000 mg/l Gesamtsaccharose gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 10 und 2500 mg/l (100 µl Probenvolumen) 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 5,0 mg/l. Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde mittels Präzisionsprofil ermittelt und beträgt 10,0 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 0,95 mg/l. Auf Basis von $\Delta E = 0,010$ wurde ein LoQ von 1,9 mg/l errechnet.

6.4. Automatisierung mittels Pictus 500

Zur Differenzierung von Saccharose und D-Glucose siehe Kapitel 5.1.2.1.

6.4.1. Bestimmungsgrenze (LoQ)

P500 Applikation	LoQ
High Range	75 mg/l
Basic Range	15 mg/l
Sensitive Range	3,8 mg/l

6.4.2. Messbereiche

P500 Applikation	Messbereich
High Range	bis 9,5 g/l
Basic Range	bis 1,9 g/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	1500	1450
Mittelwert, mg/l	1511	1499
SD, mg/l	8,33	8,60
RSD, %	0,55	0,57
Wiederfindung, %	100,8	103,4

Basic Range

Zielkonzentration, mg/l	1500	1450
Mittelwert, mg/l	1540	1501
SD, mg/l	4,32	5,33
RSD, %	0,28	0,36
Wiederfindung, %	102,7	103,5

Sensitive Range

Zielkonzentration, mg/l	150	145
Mittelwert, mg/l	152,4	1,55
SD, mg/l	0,75	1,55
RSD, %	0,49	1,03
Wiederfindung, %	101,6	103,8

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.