

UV-Test zur Bestimmung von Saccharose/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 der Summe aus Saccharose, D-Glucose und D-Fructose („Gesamtzucker“) mit β -Fructosidase (Invertase), Hexokinase (HK), Phosphoglucose Isomerase (PGI) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH).

Saccharose + H₂O $\xrightarrow{\beta\text{-Fructosidase}}$ D-Glucose + D-Fructose

D-Fructose + ATP $\xrightarrow{\text{HK}}$ Fructose-6-Phosphat + ADP

D-Glucose + ATP $\xrightarrow{\text{HK}}$ Glucose-6-Phosphat + ADP

Fructose-6-Phosphat $\xrightarrow{\text{PGI}}$ Glucose-6-Phosphat

G6P + NAD⁺ $\xrightarrow{\text{G6P-DH}}$ D-Gluconat-6-Phosphat + NADH + H⁺

Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) wird dabei zu NADH reduziert. Die gebildete NADH-Menge ist proportional zur Menge an Saccharose, D-Glucose und D-Fructose 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, β -Fructosidase, ATP, PGI
- 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.
- 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: 10 - 2000 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. Konzentration Gesamtzucker (Saccharose, D-Glucose, D-Fructose)

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünungsfaktor)
RLW: Reagenzleerwert

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

Eine Erhöhung des Probenvolumens (bis max. 1000 μ l) bei unveränderten Reagenzvolamina erfordert Umrechnung des Reagenzverdünungsfaktors (df). Bei Erhöhung des Volumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es dies Matrix-abhängig zu überprüfen.

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

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

Das Ergebnis beinhaltet die Menge an Saccharose, D-Glucose und D-Fructose in der Probe. Es wird mit dem Molekulargewicht der D-Glucose ausgewertet (180,16 g/mol) und als "Gesamtzucker" bezeichnet.

5.2. Berechnung bei Feststoffen

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir 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 % liegen.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität

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

6.2. Interferenzen & Nebenaktivitäten

Der Test zeigt keine Interferenzen mit verschiedenen relevanten Alkoholen, Säuren, Süßungsmitteln und den meisten Zuckern. Oligosaccharide des Raffinose Typs können zu einer Schleichreaktion führen, die durch rechnerische Extrapolation eliminiert werden kann.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Die Linearität ist bis 2000 mg/l Gesamtzucker gegeben (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 6 mg/l.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde mittels Präzisionsprofil ermittelt und beträgt 10 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 errechnetes LoD von 0,5 mg/l. Auf Basis von $\Delta E = 0,010$ wurde ein LoQ von 1 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 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.