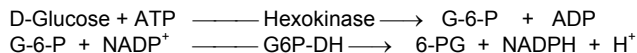


UV-Methode für ca. 32 Ansätze

Nur für den Laborgebrauch
Lagern zwischen +2 und +8 °C

Die Methode ist enthalten im deutschen, italienischen, österreichischen und schweizerischen Lebensmittelrecht, sowie in europäischen Verordnungen. Empfohlen z.B. von AOAC, IFU, AIJN, MEBAK, OICCC, OIV. Standardisiert von DIN, EN, GOST, NEN, NF.

Prinzip



Ref. Schmidt, F.H. (1961) Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander, Klinische Wochenschrift 39, 1244-1247.

Durchführung der Bestimmung

Wellenlänge: 340 nm (NADPH), $\epsilon = 6.3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
 Schichtdicke: 1,00 cm (Glas- oder Plastikkuvette)
 Temperatur: +20 bis +25 °C
 Testvolumen: 3,020 ml
 Messung: gegen Luft oder Wasser
 Probelösung: 1 bis 100 µg D-Glucose in 0,100 bis 2,000 ml Probelösung.

Reagenzien

- # 1: Pulvermischung mit Triethanolamin-Puffer, pH ca. 7,6, ca. 80 mg NADP, ca. 190 mg ATP, Magnesiumsulfat (Stabilität s. Packungsetikett). *Inhalt der Flasche # 1 mit 31 ml bidest. Wasser lösen.* Die Lösung ist 1 Monat bei +2 bis +8 °C, bzw. 2 Monate bei -15 bis -25 °C stabil.
- # 2: Ca. 0,7 ml Suspension Hexokinase (HK) / Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (G6P-DH) (ca. 200 U / 100 U) in Ammoniumsulfat (Stabilität siehe Packungsetikett). *Die Suspension ist gebrauchsfertig.* Flasche vorsichtig schwenken bevor die Suspension pipettiert wird.

Zusätzlich wird benötigt (nicht im Kit enthalten):

Standard-Lösung D-Glucose, wasserfrei, ultrapur, 0,5 g/l zur Testkontrolle.

Die Reagenzien zur Bestimmung von D-Glucose sind nicht gefährlich. Die allgemeinen Regeln beim Arbeiten in chemischen Laboratorien sollten jedoch eingehalten werden. Nach Gebrauch können die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgt werden. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

Bestimmungsansatz

In Küvetten pipettieren:	Leerwert	Standard ¹	Probe ²	Ansatz Duplikat Probe ³	Ansatz mit internem Standard ⁴	Ansatz für Spurenanalytik ⁵
Tea-Puffer NADP, ATP-Lösung # 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Probelösung⁶ (z.B. 0,05 bis 0,5 g D-Glucose/l)	-	-	0,100 ml	0,200 ml	0,100 ml	2,000 ml
Standardlösung ⁶ (z.B. 0,5 g D-Glucose/l)	-	0,100 ml	-	-	0,100 ml	-
Bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	1,800 ml	1,800 ml	-
Mischen⁷, nach ca. 3 min Extinktionen (E₁) messen. Zugeben:						
HK/G6P-DH-Suspension # 2	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Mischen⁷, nach ca. 10 bis 15 min Extinktionen (E₂) messen. Extinktionsmessungen nach weiteren 2 min wiederholen⁷						

Hinweise

- Das Mitführen eines "Standards" dient ausschließlich zur Erkennung von Unregelmäßigkeiten in der Analyse. Die Messung des Standards wird nicht benötigt zur Berechnung von Ergebnissen.
- Dieser Ansatz zusammen mit dem Leerwert ist eine „Einzelbestimmung“.
- Im Fall einer „Doppelbestimmung“ werden 2 Ansätze mit verschiedenen Probevolumina ausgeführt. Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein. Ergebnisse mit den entsprechenden Probevolumina v berechnen.
- Wiederfindung = $[(\Delta E_{\text{Probe+Standard}} - \Delta E_{\text{Probe}}) / \Delta E_{\text{Standard}}] \times 100 [\%]$.
- In der Spurenanalytik wird empfohlen, das Probevolumen bis zu 2,000 ml (0,0004 bis 0,05 g D-Glucose/l) zu erhöhen.
- Vor der Dosierung Enzympipetten, bzw. Spitzen der Kolbenhubpipetten mit Probe- bzw. Standardlösung mehrfach vorspülen.
- z.B. mit einem Plastikspatel, oder durch Umschwenken nach Verschließen der Küvette mit Parafilm® (American Can Co., Greenwich Ct., USA).
- Die Reaktion ist beendet wenn die gemessene Extinktion konstant ist. Ist dies nicht der Fall, weiter in Abständen von 2 min messen, bis die Extinktionszunahme konstant ist. Extinktionen auf die Zeit der Zugabe von HK/G6P-DH (Suspension #2) extrapolieren.

Berechnung

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe bzw. Standard}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

$$c = (V \times MW \times \Delta E) / (\xi \times d \times v \times 1000) \text{ [g D-Glucose/l Probelösung]}$$

$$c = (3,020 \times 180,16 \times \Delta E) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,8636 \times \Delta E \text{ [g D-Glucose/l Probelösung]}}$$

Wurde bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen, muss das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert werden. Bei der Analyse von Proben, die für die Analyse eingewogen werden, wird das Ergebnis auf die Einwaage bezogen.

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

Vorbereitung der Proben

Testergebnisse werden durch die untenstehenden Probeigenschaften beeinflusst. Gegebenfalls muss die entsprechende Probevorbereitung durchgeführt werden:

1. *Klare, farblose, annähernd neutrale flüssige Proben* ggf. verdünnen, um eine Probelösung mit 0,05 bis 0,5 g D-Glucose/l zu erhalten.
2. *Trübe Lösungen* filtrieren oder zentrifugieren, ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
3. *Kohlensäurehaltige Proben*, z.B. durch Filtration entgasen oder NaHCO_3 zugeben bis die Lösung schwach alkalisch ist. Ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
4. *Saure (insbesondere leicht gefärbte) Lösungen* mit KOH oder NaOH auf pH 7 einstellen, einige Minuten inkubieren oder im Fall von farblosen Proben ohne pH-Einstellung verdünnen (s. Pkt. 1).
5. *„Stark gefärbte Lösungen“*, die unverdünnt gemessen werden, mit PVPP oder Polyamid, z.B. 1 g/100 ml, behandeln, mischen, einige Minuten inkubieren, filtrieren.
6. *Feste Proben* zerkleinern (Korngröße < 0,3 mm), bzw. *halbfeste (pastöse) Proben* homogenisieren, mit Wasser extrahieren, oder in Wasser lösen, filtrieren und ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
7. *Fetthaltige Proben* mit heißem Wasser (Temperatur über dem Schmelzpunkt des Fettes) z.B. in einem 100 ml-Messkolben extrahieren. Auf +20 °C bringen, Messkolben bis zur Marke füllen. 15 min in Eis, bzw. 30 min in Kühlschrank stellen, filtrieren. Alternativ mit Carrez-Reagenzien klären (wird empfohlen).
8. *Proteinhaltige Proben* mit Carrez-Reagenzien klären: Ausreichende Menge der festen oder pastösen Probe in einen 100 ml-Messkolben einwiegen, ca. 60 ml Wasser zugeben. Oder flüssige Probe in einen 100 ml-Messkolben, der ca. 60 ml Wasser enthält, pipettieren. Nacheinander zugeben und nach jeder Zugabe mischen: 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3\text{H}_2\text{O}$ = Kalium-hexacyanoferrat(II)/100 ml), 5 ml Carrez-II-Lösung (7,20 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ = Zink-sulfat-hepta-hydrat/100 ml). Durch Zugabe von z.B. 10 ml NaOH (0,1 M) pH auf 7,5 bis 8,5 einstellen. Messkolben bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren.
9. *Proben* nur in Abwesenheit von Saccharose und Maltose mit *Perchlorsäure deproteinieren*.

Eigenschaften des Tests

1. *Spezifität* Spezifisch für D-Glucose. Bei der Analyse von handelsüblicher D-Glucose und von D-Glucose-monohydrat sind Ergebnisse von < 100 % zu erwarten, da die Substanzen feuchtigkeitsempfindlich sind.
2. *Empfindlichkeit:* 0,2 mg ($\Delta E = 0,005$; $v = 2,000$ ml; $V = 3,020$ ml)
3. *Nachweisgrenze:* 0,4 mg ($\Delta E = 0,010$; $v = 2,000$ ml; $V = 3,020$ ml)
4. *Linearität:* 1 µg/Ansatz ($v = 2,000$ ml; $V = 3,020$ ml)
bis 100 µg/Ansatz ($v = 0,100$ ml; $V = 3,020$ ml)
5. *Präzision:* $\Delta E = \pm 0,005$ Extinktionseinheiten
VK = ca. 1 bis 2 %
Fruchtsaft: $r = 0,42 + 0,027 \times c_{\text{D-Glucose in g/l}} \text{ [g/l]}$
 $R = 1,0 + 0,042 \times c_{\text{D-Glucose in g/l}} \text{ [g/l]}$
Diätbier: $x = 10 \text{ g/l}$ $r = 0,30 \text{ g/l}$
 $R = 1,22 \text{ g/l}$
Wein: $r = 0,056 \times c_{\text{D-Glucose in g/l}} \text{ [g/l]}$
6. *Störungen:* keine bekannt
7. *Technische Information:* die Reagenzien können auch zur Bestimmung von D-Fructose (mit zusätzlicher PGI) und von Saccharose (mit zusätzlicher β -Fructosidase) verwendet werden.