

Enzymatische UV-Bestimmung von Glycerin in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
2 x 50 ml R1 und 2 x 12,5 ml R2 – 50 Tests (manuell) / ≥ 500 Tests (Auto-Analysegerät)

Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

Methode & Testprinzip

Enzymatische UV-Bestimmung mit Glycerin-Kinase (GK), ADP-Hexokinase (ADP-HK) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH).

Glycerin wird mittels ATP in Gegenwart der GK zu L-Glycin-3-phosphat phosphoryliert. ADP wird mit D-Glucose über die ADP-abhängige ADP-HK zu Glucose-6-phosphat umgewandelt. In Anwesenheit der G6P-DH erfolgt die Umsetzung von D-Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphoglucono-δ-lacton und NADH.

Glycerin + ATP $\xleftarrow{\text{GK}}$ L-Glycin-3-phosphat + ADP

ADP + D-Glucose $\xleftarrow{\text{ADP-HK}}$ D-Glucose-6-phosphat + AMP

D-Glucose-6-phosphat + NAD⁺ $\xleftarrow{\text{G6P-DH}}$

6-Phosphoglucono-δ-lacton + NADH + H⁺

Die verbrauchte Menge an NAD ist der umgesetzten Menge an Glycerin äquivalent und wird bei 340 nm gemessen.

Reagenzien

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig.

- Reagenz 1: 2 x 50 ml (Puffer / NAD)
- Reagenz 2: 2 x 12,5 ml (GK, ADP-HK, G6P-DH)

Die Reagenzien sind bei 2 - 8 °C bis zum Monatsende der Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Chemikalien sollten beachtet werden. Nicht verschlucken! Berührung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten sind den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (MSDS) auf unserer Internetseite (www.r-biopharm.de) zu entnehmen. Nach Gebrauch die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgen. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

Probenvorbereitung

- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen in den Messbereich im Test einsetzen.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Generell empfiehlt sich für die Bestimmung von Glycerin eine wässrige Extraktion (z.B. 30 min bei 60 °C).
Feste und halb feste Proben zerkleinern und homogenisieren, geeignete Probemenge in einen Messkolben einwiegen und mit Wasser extrahieren; ggf. filtrieren oder Carrez-Klärung anwenden.
- Stark fetthaltige Proben in geeigneter Menge in einen Messkolben einwiegen, mit heißem Wasser extrahieren; zur Fettabcheidung abkühlen lassen (z.B. Kühlschrank oder Eisbad); Fettschicht entfernen und abschließend filtrieren.

Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
Schichtdicke: 1 cm
Temperatur: 37 °C / 20 - 25 °C
Messung: gegen Luft oder Wasser

	Reagenzienleerwert	Probe / Kontrolle
Reagenz 1	2000 µl	2000 µl
Probe / Kontrolle	-	100 µl
dest. Wasser	100 µl	-
Mischen, 1 min bei 37 °C oder 3 min bei 20 - 25 °C inkubieren. Extinktion E ₁ messen, dann zugeben:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, 5 min bei 37°C oder 10 min bei 20 - 25 °C inkubieren. Extinktion E ₂ messen.		

Der Reagenzblank muss bei jedem Lauf einmal durchgeführt werden, und von jedem Probenergebnis abgezogen werden.

Berechnung der Ergebnisse

Berechnung bei Probelösungen:

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

df: dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)

RLW: Reagenzienleerwert

$$df = \frac{(\text{Probevolumen} + R1)}{(\text{Probevolumen} + R1 + R2)} \times 100 = 0,808$$

$$c_{\text{Glycerin}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(\epsilon \times d \times v \times 1000)}$$

V:	Testvolumen [ml]	= 2,600
MG:	Molekulargewicht [g/mol]	= 92,10
d:	Schichtdicke [cm]	= 1,00
v:	Probevolumen [ml]	= 0,100
ε:	Extinktionskoeffizient NADH [l/mmol x cm]	= 6,3 (bei 340 nm)

Hieraus ergibt sich für eine Messung bei 340 nm:

$$c_{\text{Glycerin}} [\text{g/l}] = 0,3801 \times \Delta E$$

Berechnung bei Feststoffen:

$$\text{Gehalt}_{\text{Glycerin}} [\text{g}/100 \text{ g}] = \frac{c_{\text{Glycerin}} [\text{g/l}]}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} [\text{g/l}]} \times 100$$

Leistungsdaten

Spezifität

Der Test ist spezifisch für Glycerin. Dihydroxyaceton (< 0,3 g/l) und D-Glucose/D-Fructose oder Saccharose (< 50 g/L) haben keinen signifikanten Einfluss auf das Messergebnis.

Linearität & Messbereich

Linearität ist bis 1 g/l Glycerin gegeben. Der empfohlene Messbereich liegt zwischen 8 und 800 mg/l Glycerin.

Wird dieser Bereich überschritten, sollten die Proben mit dest. Wasser auf eine Glycerin-Konzentration in den Messbereich verdünnt werden. Der Verdünnungsfaktor ist bei der Berechnung zu berücksichtigen.

Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze (LoD) und die Quantifizierungsgrenze (LoQ) wurden nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung ermittelt:

- LoD = 4,0 mg/l
- LoQ = 8,0 mg/l

Automatisierung

Applikationen für Auto-Analysegeräte sind auf Anfrage erhältlich.

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.