**Enzytec™ *Liquid* Lactose/D-Galactose**

15.02.2018

Ферментативный анализ для определения лактозы / D-галактозы в пищевых продуктах и других материалах

Арт. E8110

2×50 мл R1 / 2×12.5 мл R2 (50 анализов)

Только для диагностики *in vitro*

Хранить при 2 – 8°C

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| Официальный дистрибьютор  R-Biopharm в Республике Беларусь | Официальный дистрибьютор  R-Biopharm в Российской Федерации |
| ОДО «КомПродСервис» | ООО «Неотест» |
| +375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50 | +7 (499) 649-02-01 |
| [www.kompro d.com](http://www.komprod.com) | [info@komprod.com](mailto:info@komprod.com) | [info@neo-test.ru](mailto:info@neo-test.ru) | [www.neo-test.ru](http://www.neo-test.ru) |

**Принцип**

Ферментативный тест с ß-галактозидазой (ß-Gal) и галактозодегидрогеназой (Gal-DH). Образуется НАДН, измеряемый при длине волны 340 нм:

Лактоза + H2O —— β-галактозидаза → D-глюкоза + D-галактоза

D-галактоза + НАД —— Gal-DH → D-галактоновая кислота + НАДН

**Реагенты**

Все реагенты готовы к использованию.

Реагент № 1: две виалы ≥ 50 мл (НАД, β-Gal)

Реагент № 2: две виалы ≥ 12,5 мл (Gal-DH)

Реагенты стабильны до конца месяца указанного срока годности при хранении в условиях температуры 2 – 8°C. Не замораживайте реагенты. Перед использованием дайте реактивам дойти до температуры в лаборатории (20 – 25°C).

Следует соблюдать общие правила безопасности при работе в химических лабораториях. Не глотать! Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.

Данный набор может содержать опасные вещества. Сведения об опасности содержащихся веществ см. в соответствующих паспортах безопасности материалов (MSDS) для данного продукта, доступных в Интернете по адресу www.r-biopharm.com. После использования реагенты могут быть утилизированы вместе с лабораторными отходами. Упаковочные материалы могут быть переработаны.

**Пробоподготовка**

* Используйте жидкие и прозрачные образцы непосредственно или после разбавления в соответствующем диапазоне измерений (см. характеристики испытания).
* Отфильтруйте или центрифугируйте мутные растворы.
* Дегазируйте образцы, содержащие углекислый газ.
* Осветлите образцы, содержащие белок, с помощью реагентов Карреза.
* Твердые или полутвердые образцы измельчите и гомогенизируйте, экстрагируйте водой, отфильтруйте или центрифугируйте, или, при необходимости, используйте осветление по Каррезу.
* Для образцов, содержащих жир, взвесьте образец в волюметрической колбе (мин. 5  мл) и экстрагируйте горячей водой; охладите, чтобы жир отделился; доведите до метки водой, удалите верхний жировой слой и отфильтруйте водную часть.
* Обработайте сильно окрашенные пробы (неразбавленные или с большим объемом образца) поливинилпирролидоном (PVPP) или полиамидом, напр. 1 г/100 мл.
* Осветление по Каррезу: пипетируйте жидкий образец в 100 мл колбу, содержащую около 60 мл воды или взвесьте достаточное количество образца в 100 мл колбе и добавьте около 60 мл воды. Затем осторожно добавьте 5 мл раствора Carrez-I (гексацианоферрат(II) калия (ферроцианид), 85 мМ = 3,60 г K4[Fe(CN)6] × 3 H2O/100 мл) и 5 мл раствор Carrez-II (цинк сульфат, 250 мМ = 7.20 g ZnSO4 × 7 H2O/100 мл). Отрегулируйте до pH 7.5-8.5 с помощью гидроксида натрия (0.1 M; например 10 мл). Перемешивайте после каждого добавления. Заполните колбу до отметки, перемешайте и профильтруйте.

**Примеры применения**

*Определение содержания лактозы в питьевом молоке, сгущенном молоке и кислом молоке*

Точно взвесьте около 2 г молока в объемной колбе на 100 мл. Добавьте примерно 20 мл воды и 1,0 мл трихлоруксусной кислоты (3 М) для осаждения белка. После 10 минут инкубации нейтрализуйте NaOH (1 М), долейте до 100 мл водой, отфильтруйте и используйте прозрачный, возможно, слегка опалесцирующий раствор для анализа. В случае с кислым молоком депротеинизация не требуется.

При определении лактозы в питьевом или сгущенном молоке осветление также можно проводить с помощью реактивов Карреза (см. "Определение лактозы в йогурте"). Количество взвешенного материала: около 2 г.

*Определение лактозы в твердом сыре или шоколаде*

Натрите сыр или шоколад, точно взвесьте около 2 г в 100 мл колбу, добавьте около 70 мл воды и инкубируйте в течение 15 минут при приблизительно 70°C. Время от времени встряхивайте. После охлаждения до 20-25°C долейте воды до метки и перемешайте. Чтобы отделить жир, поместите в холодильник на примерно на 20 минут и профильтруйте. Первые несколько мл отбросьте. Используйте прозрачный, возможно слегка опалесцирующий раствор для анализа.

*Определение содержания лактозы в плавленом сыре*

Точно взвесьте около 3 г однородного образца в 100 мл колбе, добавьте ок. 70 мл воды и инкубируйте в течение 15 мин при прибл. 70°C при непрерывном перемешивании на магнитной мешалке. После охлаждения до 20-25°C добавьте 2 мл трихлоруксусной кислоты (3 М) и перемешайте. Нейтрализуйте примерно 6 мл NaOH (1 M), долейте воды до метки.

Для отделения жира поместите в холодильник примерно на 20 мин, отфильтруйте или центрифугируйте. Используйте прозрачный, возможно, слегка опалесцирующий раствор для анализа.

В качестве альтернативы можно также использовать процедуру "определение лактозы в йогурте". Количество взвешенного материала: около 3 г.

*Определение лактозы в детском питании быстрого приготовления, восстановительном питании или мороженом*

Точно взвесьте около 1 г образца в колбе на 100 мл, добавьте около 60 мл воды и инкубируйте в течение 15 минут при температуре около 70°C, время от времени встряхивая. После охлаждения до 20-25°C добавьте 10 мл перхлорной кислоты (3 М) и перемешайте. Через 10 мин нейтрализуйте KOH (3 M) до pH 7, заполните до отметки водой и поместите в холодильник на 20 мин для осаждения образовавшегося KCIO4, отфильтруйте. Используйте прозрачный, возможно, слегка мутный раствор для анализа, разбавьте раствор при необходимости.

*Определение лактозы в йогурте, сухих сливках, сухом молоке или сухой сыворотке*

Точно взвесьте около 1 г образца в 100 мл колбе, добавьте около 60 мл воды и инкубируйте в течение 15 минут при температуре около 70°C; время от времени встряхивайте. Для осветления добавьте 5 мл раствора Carrez-I, 5 мл раствора Карреза-II и 10 мл NaOH (0.1 M); перемешивайте после каждого добавления, установите температуру 20-25°C и заполните до отметки водой, профильтруйте. Для анализа используйте прозрачный, возможно, слегка мутноватый раствор, при необходимости разбавленный.

*Определение лактозы в мясной колбасе и мясном рулете*

Точно взвесьте около 5 г нарезанного или натертого образца в 100 мл колбе, добавьте около 70 мл воды и инкубируйте в течение 15 мин при температуре около 70°C. Дайте остыть до 20-25°C и долейте до метки водой. Для отделения жира поместите в холодильник на 20 мин и отфильтруйте. Для анализа используйте прозрачный, возможно, слегка мутный раствор.

*Определение лактозы в образцах, содержащих белок*

Добавьте перхлорную кислоту (1 М) к растворам образцов, содержащих белок, в соотношении 1:3 (1+2), перемешайте, отцентрифугируйте и нейтрализуйте аликвотную часть надосадочного раствора KOH (2 М). Долейте до определенного объема в колбу, поместите в холодильник на 20 мин для осаждения KCIO4 и отфильтруйте. Используйте прозрачный раствор для анализа, при необходимости разбавляя его.

**Процедура анализа**

Длина волны: 340 нм

Оптический путь: 1,00 см

Температура: 20 – 25°C

Измерение: против воздуха или воды

Раствор образца: 30 – 2000 мг/л

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Бланк** | **Образцы** |
| **Образец/Стандарт**  **Дист. вода**  **Реагент 1** | -  100 мкл  2000 мкл | 100 мкл  -  2000 мкл |
| Смешайте, инкубируйте в течение 20 мин при температуре 20 – 25℃. Измерьте оптическую плотность А1, затем добавьте: | | |
| **Реагент 2** | 500 мкл | 500 мкл |
| Смешайте, дождитесь окончания реакции (≥ 15 мин при температуре 25℃ или ≥ 40 мин при температуре 20℃). Измерьте оптическую плотность А2. | | |

Бланк должен быть проанализирован каждый раз для каждого цикла и вычтен из каждого образца при расчете результатов.

**Расчет результатов**

***Общая лактоза (лактоза + свободная D-галактоза)***

∆А = (А2 – df × А1)образца – (А2 – df × А1)RB

df = коэффициент разбавления оптических плотностей в зависимости от объемов реагентов:

df = (образец + R1) / (образец + R1 + R2) = 0.808

**c** = (V × MW × ∆A) / (ε × d × v × 1000) [в г/л общей лактозы]

**c** = (2,600 × 342.30 × ∆A) / (ɛ ×1 × 0,1 × 1000)

Результаты определения при длине волны 340 нм (= 6,3 л × ммоль-1 × см-1):

**С**Общей лактозы[г/л] = 1.413 × ΔA

***Расчет дифференцированной лактозы***

Чтобы получить истинное значение лактозы, необходимо вычесть результат анализа на содержание D-галактозы:

Приведенный выше результат включает количество лактозы плюс свободную D-глюкозу, присутствующую в образце. Он рассчитывается как "Общая лактоза" с учетом молекулярной массы лактозы (342,3 г/моль). Для дифференциации двух сахаров свободная D-галактоза должна быть измерена с помощью анализатора EnzytecTM *Liquid* D-Galactose (E8120) в отдельном анализе. Лактоза рассчитывается путем вычитания свободной D-галактозы из общего количества лактозы с учетом соотношения между молекулярными массами обоих сахаров:

Слактозы [г/л] = Cобщей лактозы – 1.90 × Cгалактозы

*Пример:*

Общая лактоза (8110) 1,500 г/л

D-галактоза (Е8120) 0,400 г/л

Лактоза = 1,500 г/л – 1,90 × 0,400 г/л = 0,740 г/л

Если соотношение D-галактоза/лактоза превышает 10:1, точность определения лактозы снижается.

**Характеристики анализа**

**Специфичность:**

Тест специфичен для лактозы и свободной D-галактозы. Кроме D-галактозы, Gal-DH также окисляет L-арабинозу до 100%. Аллолактоза и лактулоза распознаются ß-Gal примерно на 80% и 30% соответственно.

**Диапазон измерения:**

Рекомендуемый диапазон измерений составляет 50 - 2000 мг/л (лактоза и D-галактоза). Если значения превышают этот диапазон, образцы должны быть разбавлены в пределах 100 – 2000 мг/л.

**Чувствительность:**

Предел обнаружения (LoD) и предел количественного определения (LoQ) определялись в соответствии с методом DIN 32645:2008-11:

* LoD = 30 мг/л (Общей лактозы)
* LoQ = 50 мг/л (Общей лактозы)

**Автоматизация**

Документы по применению автоматизированных систем предоставляются по запросу.

**Отказ от ответственности**

Эти данные соответствуют современному уровню развития технологий и содержат информацию о наших продуктах и их применении. Компания R-Biopharm не дает никаких гарантий, выраженных или подразумеваемых, за исключением того, что материалы, из которых изготовлена ее продукция, имеют стандартное качество. Дефектные продукты будут заменены. Не существует гарантии товарного состояния данного продукта или пригодности продукта для каких-либо целей. R-Biopharm не несет ответственности за любой ущерб, включая специальный или косвенный ущерб, или расходы, возникшие прямо или косвенно в результате использования данного продукта.

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| Техническая поддержка и прием заявок: | |
| +375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50, +7 (499) 649-02-01 | |
| [info@komprod.com](mailto:info@komprod.com) | [support@komprod.com](mailto:support@komprod.com) | [info@neo-test.ru](mailto:info@neo-test.ru) | |