

# Enzytec™ *Liquid*

## Часто задаваемые вопросы

13.04.2021



Линейка Enzytec™ *Liquid*

## Содержание

<b>1</b>	<b>Общие вопросы</b>	<b>5</b>
1.1	Общие характеристики наборов	5
1.1.1	В чем разница между <i>E-Fluid</i> и <i>E-Liquid</i> ?	5
1.1.2	Каковы особенности и преимущества реагентов <i>E-Liquid</i> ?	5
1.1.3	Соответствуют ли продукты Enzytec™ Liquid стандарту CE?	5
1.1.4	Производится ли линия Enzytec™ Liquid в соответствии с ISO?	5
1.1.5	Почему не указана концентрация фермента?	6
1.1.6	Одобрены ли эти ферментативные методы AOAC?	6
1.1.7	Как долго можно транспортировать наборы без охлаждения?	6
1.1.8	Нормально ли видеть хлопья (частицы) в некоторых реагентах?	6
1.2	Общие вопросы по применению	7
1.2.1	Почему тесты Enzytec™ Liquid имеют поправочный коэффициент для оптической плотности?	7
1.2.2	Почему OD холостой пробы снижается с A1 до A2 (или A3)?	7
1.2.3	Можно ли использовать холостую пробу в качестве эталонной длины волны?	8
1.2.4	Нужно ли измерять холостой образец?	8
1.2.5	Можно ли увеличить объем образца, как в наборах Roche?	8
1.2.6	Разрешено ли использовать эти тесты для клинической диагностики?	8
1.3	Стандарты	9
1.3.1	Почему стандарты не включены в наборы?	9
1.3.2	Какие есть стандарты для приложений, выполняемых вручную, и стандарты для автоматизации?	9
1.3.3	Можно ли купить стандарты в другом месте?	9
1.4	Производительность теста	10
1.4.1	В чем разница между нижним пределом обнаружения и диапазоном измерения?	10
1.4.2	Статистические инструменты для извлечения	10
<b>2</b>	<b>Тест-системы и приложения (в алфавитном порядке)</b>	<b>12</b>
2.1	Уксусная кислота (E8226)	12
2.1.1	Почему вы выбрали этот ферментативный путь с ADP-НКР?	12
2.2	Аммиак (E8390)	12
2.2.1	Какая пробоподготовка рекомендуется?	12
2.2.2	Включена ли в состав реагента система осветления?	13
2.3	Этанол (E8340)	13
2.3.1	Как осуществляется расчет между этанолом в г/л и % (ABV)?	13
2.3.2	Почему в наборе для этанола нет AL-DH?	13
2.3.3	Почему эти реагенты не подходят для алкогольных напитков?	13
2.3.4	Почему обязательна температура 20-25 °C?	14
2.3.5	Как следует измерять стандарт E5420?	14
2.3.6	Как следует готовить образцы с высоким содержанием этанола?	14
2.4	D- или L-Молочная кислота	14
2.4.1	Почему набор D-молочной кислоты (E5120) не заменяется похожим?	14

2.4.2	Почему в наборе для L-Молочной кислоты нет GPT, но есть гидразин?	15
2.4.3	Почему получилось очень низкое значение для холостой пробы?	15
2.4.4	Почему реагенты имеют сильный запах?	15
2.5	Лактоза / Галактоза (E8110 + E8120)	15
2.5.1	Какие наборы необходимы и для какого количества тестов?	15
2.5.2	Какие средства контроля качества вы рекомендуете для лактозы?	16
2.5.3	Какие средства контроля качества вы рекомендуете для галактозы?	16
2.5.4	Нормально ли видеть белый осадок в R2?	16
2.6	Лактоза / Глюкоза (E8130 + E8140)	17
2.6.1	Какие средства контроля качества вы рекомендуете для лактозы?	17
2.6.2	Какие наборы необходимы и для какого количества тестов?	17
2.6.3	Можно ли измерить содержание лактозы в безлактозных продуктах?	17
2.7	Сахара в общем	18
2.7.1	Какие наборы необходимы для тестирования сахарозы, глюкозы и фруктозы?	18
2.7.2	Можно ли тестировать мальтозу с помощью наборов E-Liquid?	18
2.8	Глюкоза/Фруктоза (E8160)	19
2.8.1	Как заменить старый набор D-фруктозы (E5120) на глюкозу/фруктозу (E8160)?	19
2.9	Сахароза/Глюкоза (E8180)	20
2.9.1	Как производится расчет?	20
2.10	Сахароза/Глюкоза/Фруктоза (E8190)	20
2.10.1	Можно ли различить 3 сахара?	20
2.10.2	Почему вы используете название «Общий сахар» и что оно означает?	21
2.10.3	Какова токсичность имидазольного буфера?	21
2.10.4	Почему необходимо корректировать сахарозу с коэффициентом 1,053?	21
2.11	Общий сульфит (SO <sub>2</sub> с E8600 и E8610)	22
2.11.1	Какой принцип используется?	22
2.11.2	Почему набор не работает с законом Ламберта-Бера?	22
2.11.3	Почему обработка проб очень важна для SO <sub>2</sub> ?	22
2.11.4	Как должны быть подготовлены стандарты и образцы, чтобы они были стабильными?	23
2.11.5	Можно ли использовать Carrez для тестирования сульфита?	24
2.11.6	В чем разница между колориметрическими анализами?	24
2.11.7	Почему существуют различия в эталонных и колориметрических методах?	25
2.11.8	Заключение о противоречивых результатах	26
2.12	SO <sub>2</sub> -Общий (E8600)	26
2.12.1	В чем разница между анализами E-Liquid, Roche и RCS?	26
2.12.2	Какой LoQ (ПКО) по сравнению с Roche?	26
2.12.3	Какова подготовка проб по сравнению с Roche?	27
2.12.4	Что можно использовать для контроля качества?	27
2.12.5	Насколько сильны помехи от нитритов?	28
2.13	SO <sub>2</sub> -Свободный (E8610)	28
2.13.1	Что можно использовать для контроля качества?	28

2.13.2	Можно ли инкубировать более 5 минут?	30
2.13.3	Насколько стабилен свободный SO <sub>2</sub> в образцах вина?	30
2.13.4	Как избежать потерь SO <sub>2</sub> ?	31
2.13.5	Почему Калибратор показывает только 50 мг/л?	31
2.13.6	Как долго калибратор остается стабильным после открытия?	31
2.13.7	Какова корреляция для красных вин?	31
2.14	Мочевина / Аммиак (E8395)	32
2.14.1	Как производится расчет?	32
<b>3</b>	<b>Применение в автоматизированных системах (только вопросы, относящиеся к Enzytec Liquid)</b>	<b>33</b>
3.1	Общие вопросы (автоматизированный Liquid)	33
3.1.1	Почему жидкие реагенты идеально подходят для автоматизации биохимических анализаторов?	33
3.1.2	Что происходит с принципом 4+1+1, когда на приборе доступно менее 3 реагентов?	33
3.1.3	Как можно закончить один реагент раньше других?	33

# 1 ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

## 1.1 ОБЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРОВ

### 1.1.1 В чем разница между E-Fluid и E-Liquid?

Основное различие заключается в том, что Enzytec™ Fluid производится компанией Thermo, а Enzytec™ Liquid производится компанией R-Biopharm. Общие преимущества жидких и стабильных реагентов одинаковы для обеих линеек:

- Реагенты жидкие и готовые к использованию (без потерь времени на восстановление и без погрешностей)
- Реагенты стабильны даже после вскрытия (отсутствие отходов реагентов при малом количестве анализов или для автоматизации)
- Одинаковая схема пипетирования для всех тестов (простота использования и меньше ошибок)
- Всего 2 реагента (легкое применение на любом биохимическом анализаторе)

А вот новые реагенты *Enzytec Liquid* были модифицированы и улучшены:

- Улучшена производительность теста (например, линейность, надежность и стабильность)
- Количество реагентов всегда будет ограничено R1 и R2 (без R3), например, с Enzytec™ Liquid L-Malic acid. Этот момент очень полезен для автоматизированных клиентов: поскольку многие анализаторы могут пипетировать только два реагента, необходимо было смешивать L-Malic R2 и R3, что снижало стабильность смешанного реагента. Сейчас реагентов всего 2, поэтому они используются без смешивания и стабильны до конца срока годности.

Кроме того, наборы Enzytec™ Liquid на 25 % больше, а области применения те же, поэтому количество тестов в наборе на 25 % больше:

- Enzytec Fluid = 80 мл R1 + 20 мл R2, что означает 40 тестов в ручном режиме (2000 мкл R1 / 500 мкл R2) и 500 тестов в автоматическом режиме (160 мкл R1 / 40 мкл R2)
- Enzytec Liquid = 100 мл R1 + 25 мл R2, что означает 50 тестов в ручном режиме и 625 тестов в автоматическом режиме

### 1.1.2 Каковы особенности и преимущества реагентов E-Liquid?

Enzytec™ Liquid — это серия ферментных тест-наборов производства R-Biopharm, которые предлагают жидкие, готовые к использованию и стабильные реагенты со следующими преимуществами:

- Для небольших лабораторий наборы можно открыть для проведения нескольких тестов и положить обратно в холодильник для дальнейшего использования (срок годности остается прежним даже после открытия).
- Для крупных лабораторий реагенты можно использовать на любом биохимическом анализаторе, даже на менее гибком, благодаря жидкостному, стабильному и двухреагентному формату.

Особенности и преимущества:

- Реагенты жидкие и готовые к использованию ⇒ Не тратится время на восстановление и нет ошибок
- Реагенты стабильны до истечения срока годности, даже после вскрытия ⇒ Нет отходов реагентов
- Одинаковая схема пипетирования для всех тестов ⇒ Простота использования и меньше ошибок
- Всего 2 реагента ⇒ простота применения на любом биохимическом приборе

### 1.1.3 Соответствуют ли продукты Enzytec™ Liquid стандарту CE?

Стандарт CE распространяется только на медицинские товары. Поскольку наборы и реагенты Enzytec™ не являются медицинскими изделиями, они не должны соответствовать этому стандарту и не должны иметь маркировку CE.

### 1.1.4 Производится ли линия Enzytec™ Liquid в соответствии с ISO?

Наборы E-Liquid производятся компанией R-Biopharm в Дармштадте, поэтому они имеют сертификат ISO.

### 1.1.5 Почему не указана концентрация фермента?

Концентрация фермента указана в реагентах Enzytec Fluid и не указана в реагентах Enzytec Liquid. Причины тому следующие:

- Ферментативная активность, указанная производителями, не всегда надежна и сопоставима между различными источниками (мы проверяем ее в соответствии с нашим собственным методом утверждения и соответствующим образом корректируем количество).
- Поскольку ферменты нестабильны, их активность со временем будет снижаться, поэтому количество, указанное во вкладыше, будет неверным.

Если заказчик хочет сравнить активность 2-х наборов, то для выбора лучшего лучше всего протестировать высококонцентрированные образцы до максимума фотометра ( $A = 4,0$  или  $5,0$  для лучших моделей): при тест нелинейный, это означает, что количества фермента больше не достаточно, поэтому тест с наилучшей линейностью также является тестом с самой высокой активностью фермента.

Если 2 тест-набора остаются линейными до максимума фотометра, разбавьте реагенты с фактором 2 водой и повторите эксперимент, пока один из 2-х тестов не станет нелинейным.

### 1.1.6 Одобрены ли эти ферментативные методы AOAC?

#### a.) Наборы Roche

Ферментативные реакции, используемые в линии E-Liquid, аналогичны методам Boehringer Mannheim, существующим уже 40 лет. В каждом листе-вкладыше от компании «Рош» указано, какими организациями рекомендованы эти методы. Если метод, используемый в соответствующем наборе жидкости, одинаков, то это означает, что набор жидкости также одобрен указанной организацией (но иногда метод отличается, например, для уксусной кислоты).

Что касается AOAC, были одобрены следующие методы из линейки Roche (подробности в каждой IFU):

- L-Malic в вине и фруктовых соках
- Глюкоза/фруктоза в вине

Поскольку методы, используемые в линии Liquid, идентичны методам линии Roche для этих двух наборов, их можно рассматривать как аналогичные AOAC.

#### b.) Наборы Enzytec

Мы представили комплект Enzytec Fluid Ethanol для одобрения AOAC в чайном грибе, безалкогольном пиве и фруктовых соках, и мы прошли первый этап утверждения (Первое действие).

Мы представим другие тест-наборы в ближайшие месяцы и годы.

### 1.1.7 Как долго можно транспортировать наборы без охлаждения?

При разработке комплекта проверяется его устойчивость к высоким температурам в соответствии с так называемой «процедурой стресс-тестирования»: комплекты подвергают стрессу при  $37^{\circ}\text{C}$  и/или  $55^{\circ}\text{C}$  в течение 3 недель (начиная с одной недели при высокой температуре). Это моделирование на 6 месяцев при  $4^{\circ}\text{C}$ , мы подчеркиваем их 3 недели = 18 месяцев).

Но это также означает, что комплекты способны противостоять высокой температуре при транспортировке. По этой причине комплекты поставляются без охлаждающих пакетов. При отправке комплектов в южную часть мира время транспортировки составляет 5-8 дней, но при этом комплекты выдерживают это длительное время и высокие температуры.

Вообще говоря, все компании, занимающиеся диагностикой (IVD для диагностики человека, анализ продуктов питания и окружающей среды), отправляют наборы при комнатной температуре. Все используемые наборы, будь то иммунология, клиническая химия или ферментативный анализ, очень похожи по своему составу (буферы, ферменты, антитела). Все эти комплекты проходят стресс-тестирование по описанным выше правилам, которые распространяются на всю отрасль, и опыт показывает, что все виды комплектов выдерживают воздействие высокой температуры в течение нескольких дней.

### 1.1.8 Нормально ли видеть хлопья (частицы) в некоторых реагентах?

Это может случиться так, что вы увидите, как некоторые хлопья (частицы) плавают в реагенте и медленно опускаются на дно флакона. Это не влияет на результаты, действуйте, как обычно, и проверьте значения вашего элемента управления. Пожалуйста, не фильтруйте раствор, всегда оставляйте его вверх дном и избегайте пипетирования частиц, которые находятся на дне.

## 1.2 ОБЩИЕ ВОПРОСЫ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

### 1.2.1 Почему тесты Enzytec™ Liquid имеют поправочный коэффициент для оптической плотности?

Обычная формула для расчета A в ферментативных тестах следующая:  $\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{образец}} - (A_2 - A_1)_{\text{хол.проба}}$

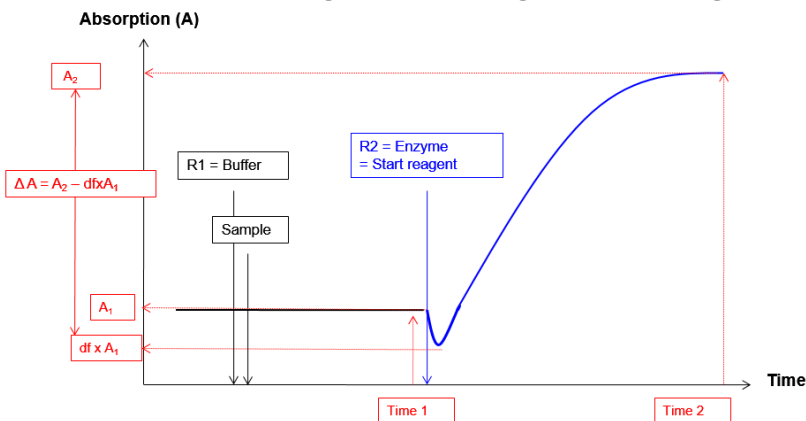
Для линейки Enzytec™ Liquid формула отличается, поскольку вводится коэффициент разбавления для оптических плотностей:

$$\Delta A = (A_2 - df \times A_1)_{\text{образец/стандарт}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{хол.проба}}$$

где df = коэффициент разбавления оптических плотностей:

$$Df = (\text{объем образца} + R1) / (\text{объем образца} + R1 + R2) = 0.808 \text{ например (см. вкладыши).}$$

Причина этого в том, что ферментативные тесты основаны на разнице в оптической плотности, измеренной между A1 (до начала реакции с добавлением R2) и A2 (конечная точка реакции). Однако добавление фермента с реагентом R2 не только запускает реакцию, но и разбавляет смесь образца + R1, в которой измеряли A1. Это означает, что реакция начнется не с A1, а с A1, разбавленного добавлением R2. Коэффициент df корректирует этот эффект разбавления.



В линейке Roche объем реагента для фермента обычно мал (20 мкл) по сравнению с объемом R1+образец (3 мл). Поэтому коэффициент разбавления оптических плотностей мал (около 1%) и его можно не учитывать. Но для Enzytec™ Liquid объем R2 составляет 500 мкл по сравнению с образцом 100 мкл + 2000 мкл R1, поэтому разбавление оптических плотностей важно, и этот фактор нельзя не учитывать.

Если образцы сильно окрашены, фактор df даже более важен, потому что A1 высок, поэтому  $df \times A1$  сильно отличается от одного только A1 (если A1 низкий, это не имеет большого значения). Если используется автоматический прибор, убедитесь, что программное обеспечение учитывает коэффициент разбавления df. Некоторые старые инструменты не имеют этого фактора, поэтому в этом случае необходимо обесцвечивать образцы (например, добавляя PVPP в R1). Современные инструменты всегда имеют коэффициент df, и он обычно описан в руководстве пользователя (пример Cobas 6000 доступен по запросу).

### 1.2.2 Почему ОП бланка снижается с A1 до A2 (или A3)?

В наборах Roche образец и буфер смешиваются с водой и A1 измеряется в большом объеме (около 3 мл). Первое измерение A1 содержит поглощение буфера NAD и всегда низкое (образец заменяется водой, поэтому цвет не увеличивает значение A1). Затем добавляют исходный фермент в виде очень небольшого объема реагента (от 20 до 50 мкл) и измеряют A2 в конце реакции. Из-за небольшого объема добавляемого ферментного реагента эффект разбавления отсутствует, поэтому абсорбция A2 всегда выше, чем A1, а  $\Delta A = A_2 - A_1$  представляет холостой реагент, который вычитается из каждого образца.

Для Enzytec™ Liquid принцип остается тем же. Но поскольку объем исходного фермента R2 велик (500 мкл) по сравнению с образцом R1 + (2100 мкл), возникает эффект разведения на первую оптическую плотность A1. По этой причине вводится коэффициент разбавления df и формула  $\Delta A = A_2 - df \times A_1$ .

Для холостого реагента специфической реакции не происходит, поэтому эффект разбавления означает, что оптическая плотность уменьшается с A1 до A2 (или A3 в случае глюкозы/фруктозы). Например, для глюкозы/фруктозы значения  $A1/A2/A3 = 0,115, 0,098$  и  $0,083$ , но с учетом фактора df скорректированные значения больше не уменьшаются:

$$\Delta A_{\text{хол.проба глюкозы}} = A_2 - df \times A_1 = 0.098 - 0.115 \times 0.808 = 0.005$$

$$\Delta A_{\text{хол.проба фруктозы}} = A_3 - df \times A_2 = 0.083 - 0.098 \times 0.839 = 0.001$$

Таким образом, несмотря на уменьшающееся поглощение, эти 2 пустых образца являются положительными (очень низкими), и их необходимо вычитать из каждого образца в серии.



### 1.2.3 Можно ли использовать холостую пробу в качестве эталонной длины волны?

Да, можно запрограммировать бланк реагента в качестве эталонной длины волны и автоматически вычитать его из каждого образца при условии, что используется коэффициент  $df$ .

Математическая демонстрация выглядит следующим образом:

$$\Delta A = (A2_{\text{образец}} - 0,808 * A1_{\text{образец}}) - (A2_{\text{RB}} - 0,808 * A1_{\text{RB}})$$

is like  $\Delta A = A2_{\text{образец}} - 0,808 * A1_{\text{образец}} - A2_{\text{RB}} + 0,808 * A1_{\text{RB}}$

is like  $\Delta A = A2_{\text{образец}} - A2_{\text{RB}} - 0,808 * A1_{\text{образец}} + 0,808 * A1_{\text{RB}}$

is like  $\Delta A = (A2_{\text{образец}} - A2_{\text{RB}}) - (A1_{\text{образец}} - A1_{\text{RB}}) * 0,808$

Вот пример такого же расчета на примере теста на этанол:

	R-Biopharm IFU		
	A1	A2	A2 – 0,808*A1
Хол. проба	0,053	0,236	0,194
Проба 1	0,051	1,507	1,272
Проба 2	0,055	0,399	0,161
Проба 3	0,067	1,015	0,767
Проба 4	0,055	1,748	1,510
Проба 5	0,085	0,783	0,521

Расчет с эталонной длиной волны		
A1 <sub>образец</sub> – A1 <sub>хол.проба</sub> (0,053)	A2 <sub>образец</sub> – A2 <sub>хол.проба</sub> (0,236)	(A2 <sub>образец</sub> - A2 <sub>хол.проба</sub> ) – ((A1 <sub>образец</sub> - A1 <sub>хол.проба</sub> )*0,808)
-	-	-
-0,002	1,271	1,272
0,002	0,163	0,161
0,014	0,779	0,767
0,003	1,512	1,510
0,032	0,547	0,521

### 1.2.4 Нужно ли измерять холостую пробу?

Как описано выше, цвет образцов учитывается с помощью  $\Delta A$ . Если он слишком высок, его следует удалить разбавлением, методом Карреза или PVP / PVPP.

Нет смысла делать холостой образец для цветных образцов, цвет учитывается в первом измерении A1 и вычитается из A2.

Холостой образец полезен только в том случае, если образец вызывает реакцию ползучести или любую неспецифическую реакцию, которую необходимо измерить и вычесть. Но проще и дешевле измерить реакцию ползучести всех образцов, измерив A3 после основной реакции, и вычесть ее экстраполяцией из общего времени инкубации (метод доступен по запросу).

### 1.2.5 Можно ли увеличить объем образца, как в наборах Roche?

В случае Roche и Enzytec Generic реагенты концентрированы, поэтому вода добавляется непосредственно в кювету. По этой причине можно увеличить объем пробы до 2 мл и соответственно уменьшить количество воды.

Для Enzytec™ Liquid это невозможно, так как реагенты готовы к использованию и вода не добавляется. Можно увеличить объем пробы и соответственно уменьшить R1, но при этом изменится концентрация ферментов в тесте. Поэтому мы рекомендуем увеличивать объем пробы только до 500 мкл (уменьшить R1 до 1600 мкл), не более того. При тестировании нового приложения и особенно при увеличении объема образца мы рекомендуем проверить приложение, проверив внутренние элементы управления на нескольких образцах.

### 1.2.6 Можно ли использовать эти тесты для клинической диагностики?

В прошлом образцы сыворотки или крови тестировались ферментативными методами. Несколько применений, таких как определение L-молочной кислоты у спортсменов или определение содержания лимонной кислоты в семенной жидкости, описаны в литературе и включены во вкладыши Boehringer Mannheim. Тем не менее, с 1998 года Европейский регламент IVD (диагностика in vitro) требует регистрации всех тестов для клинического применения. Поскольку эти наборы не зарегистрированы как тесты для диагностики in vitro, все клинические применения были изъяты из вкладышей в упаковку. Должна ли лаборатория использовать эти тесты для образцов



человека, следуя инструкциям, описанным в литературе, это может быть сделано только в исследовательских целях. Scil Diagnostics не поддерживает какие-либо клинические приложения для этих тестов.

## 1.3 СТАНДАРТЫ

### 1.3.1 Почему эталоны не входят в наборы?

В начале запуска линейки Enzytec было решено, что стандарты будут разделены. Это имеет смысл, когда стандарты являются многоцелевыми стандартами, такими как стандарт на несколько сахаров (глюкоза, фруктоза и сахароза) или стандарт на несколько кислот (много разных кислот): в этом случае вы покупаете только один стандарт и можете использовать его для нескольких комплектов.

Теперь для других стандартов, в которые включен только один аналит, мы могли бы включить стандарт в набор. Но некоторые клиенты предпочитают свои собственные стандарты или стандарты своих профессиональных организаций (например, для винных лабораторий существуют стандарты Titrivins во Франции или стандарт Weinanalytiker в Германии). Поэтому мы решили оставить стандарты снаружи, и каждый может выбрать те стандарты, которые ему нужны.

### 1.3.2 Почему у вас есть стандарты для ручного применения и стандарты для автоматизации?

В линейке Enzytec R-Biopharm предлагает 2 вида стандартов (мультикислоты и сахара) с 2 различными уровнями концентрации (ручное применение и автоматическое), что означает всего четыре стандарта. Слово «стандарт» является общим названием образца с известным составом и может использоваться как для контроля качества, так и в качестве калибратора.

Стандарты для ручного применения (руководство Standard Sugars E5440 и Standard Multi-acid manual E1240):

В ручных приложениях стандарты не используются для калибровки теста (поскольку он реализован как тест конечной точки с законом Ламберта-Бера). Эти стандарты используются в качестве образцов для контроля качества. По этой причине выбраны низкие концентрации, чтобы проверить результаты вблизи предела обнаружения, где требуется максимальная точность (в диапазоне от 0,2 г/л до 0,5 г/л для большинства параметров).

Стандарты для автоматизации (стандартная автоматизация сахара E5450 и стандартная автоматизация Multi-acid E1241):

В анализаторах клинической химии стандарты используются для калибровки теста в широком диапазоне измерений. По этой причине концентрации стандартов могут быть высокими (в пределах 5 г/л для кислот и 50 г/л для сахаров). Эти стандарты используются для изготовления нескольких калибровочных точек путем соответствующих разбавлений.

Конечно, всегда можно использовать самодельные стандарты или другие внешние стандарты:

- изготовлением самодельных стандартов после покупки сверхчистой яблочной кислоты, молочной кислоты, глюкозы, фруктозы и т. д. и взвешиванием калибраторов в желаемых концентрациях (это самодельные синтетические калибраторы);
- покупая уже предварительно разведенные синтетические стандарты, но у компаний, которые не являются производителем реагентов (некоторые клиенты предпочитают покупать контроли и калибраторы у независимых поставщиков);
- покупая многоцелевые калибраторы и/или контроли у ассоциаций энологов; в основном это образцы вина, которые были смешаны и переработаны в контроли и/или калибраторы с заданными концентрациями (во Франции наиболее известные контроли называются «титривинами», и их можно приобрести за границей).

### 1.3.3 Можно ли купить стандарты в другом месте?

Стандарты можно купить у Thermo или у Diasys GmbH:

Thermo			Diasys		
Наименование	Арт. №	Концентрация	Наименование	Арт. No	Концентрация
Стандарт мочевины	984388	≈ 500 мг/л	Стандарт мочевины FS	1 3100 99 10 030	50 мг/дл
Стандарт глицерина	984386	≈ 200 мг/л	Стандарт триглицеридов FS	1 5700 99 10 030	глицерин ≈ 200 мг/л
Стандарт Гидроксимасляной кислоты	984392	= 0.104 г/л = 1 ммоль/л	Гидроксibuтират Стандарт FS	1 3700 99 10 030	1 ммоль/л
Стандарт Холестерола	984391	≈ 2000 мг/л	Стандарт холестерина FS	1 1300 99 10 030	200 мг/дл

Эти продукты доступны от Diasys или их дистрибьюторов (например, Diasys-Greiner Biochemica in Flacht для Германии, Sorachem для Бельгии/Голландии и DiaSys-Poles France для Франции).

## 1.4 ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ ТЕСТА PERFORMANCE

### 1.4.1 В чем разница между нижним пределом обнаружения и диапазоном измерения?

Возьмем пример со вкладышем в упаковке L-яблочная кислота, где результаты теста описаны следующим образом.

Диапазон измерений:

Анализ был разработан для определения концентрации L-яблочной кислоты в диапазоне измерений от 20 до 500 мг/л ( $\Delta A$  при 340 нм = соответственно 0,036 и 0,900 [A]).

Действительно, формула Ламберта-Бера [ $c = 0,5534 \times \Delta A$ ], поэтому расчет дает:

– 0,020 (г/л) =  $0,5534 \times 0,036$  ( $\Delta A$ ), что означает, что 20 мг/л соответствуют  $\Delta A$ , равному 0,036 (A).

– 0,500 (г/л) =  $0,5534 \times 0,903$  ( $\Delta A$ ), что означает, что 500 мг/л соответствует  $\Delta A$  0,903 (A)

Эти два предела соответствуют общему правилу для всех ферментативных препаратов, которое гласит:

– ниже 0,050 ( $\Delta A$ ) измерение не является точным и воспроизводимым, поэтому 0,036 действительно мало;

– выше 1.500 ( $\Delta A$ ) тесты, как правило, перестают быть линейными, но для подстраховки лучше брать 1.000 ( $\Delta A$ ) как максимум.

– По этой причине тесты очень часто имеют коэффициент 20 для диапазона измерений, что более или менее соответствует правилу от 0,050 до 1,000 A.

В случае L-Malic мы выбрали пределы 0,036 (A) и 0,900 (A), что более или менее соответствует общему правилу от 0,050 (A) до 1,000 (A).

### ПО и ПКО

На листке-вкладыше указано, что LoD и LoQ составляют соответственно 4 мг/л и 10 мг/л. Согласно формуле Ламберта-Бера это означает:

– 0,004 (г/л) =  $0,5534 \times \Delta A$ , значит, 4 мг/л соответствуют  $\Delta A = 0,007$  (A)

– 0,010 (г/л) =  $0,5534 \times \Delta A$ , что означает, что 10 мг/л соответствуют  $\Delta A = 0,018$  (A)

Этот предел очень низок, и его нелегко достичь. В R-Biopharm мы рекомендуем использовать  $\Delta A = 0,020$  (A) в качестве нижнего предела обнаружения, иначе результаты не будут воспроизводимы. Для L-Malic это соответствует 11 мг/л.

### 1.4.2 Статистические инструменты для извлечения

#### a.) Закон Ламберта-Бера и извлечение +/- 5%

Первое правило состоит в том, что ферментативные методы следуют закону Ламберта-Бера; Это стехиометрическая реакция, поэтому теоретически она дает 100 % извлечение. Однако общее правило заключается в том, что он дает +/- 5% восстановления из-за ошибок в процедуре тестирования:

- ошибка пипетирования (из-за пипеток или из-за оператора)
- погрешность измерения фотометром (A1 и A2)

#### b.) Стандартное отклонение и CV

Правило +/- 5% является общим правилом, и очевидно, что оно применимо не везде:

- CV отличается в зависимости от уровня концентрации
- Оборудование и операторы не имеют одинаковой надежности в каждой лаборатории по всему миру
- Приложения могут различаться даже для ручного применения (извлечение пробы и объем пробы в тесте).
- Автоматизированные приложения все разные

Поэтому имеет смысл измерять реальный диапазон извлечения в лаборатории по установленным статистическим правилам.

Первое статистическое правило состоит в том, что стандартное отклонение и CV различны в зависимости от уровня концентрации: они высоки в низком диапазоне и улучшаются при использовании более высоких концентраций. Таким образом, необходимо измерить реальную CV из лаборатории, по крайней мере, на трех разных уровнях диапазона измерений: низком, среднем и высоком диапазонах. Для этого необходимо выполнить от 10 до 20 измерений одного и того же образца (минимум 9 измерений, см. ниже).

После измерения стандартного отклонения (для каждой из 3 выборок) применяются вторые статистические правила:

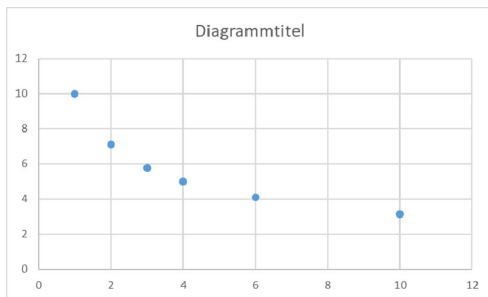
- 65 % измерений находятся в пределах 1-кратного стандартного отклонения (Sd)
- 95 % измерений находятся в пределах 2x Sd
- 99% измерений находятся в пределах 3x Sd

Это означает, что при измерении образца с помощью одного теста он будет не на ожидаемом уровне, а в диапазоне 3x Sd вокруг среднего значения.

Если этот диапазон 3x Sd слишком высок для лаборатории, то необходимо применить третье статистическое правило. Действительно, дальность уменьшается в зависимости от повторов, по следующим правилам:

$$\text{Отклонение (для повторов } n) = \text{отклонение для одного измерения} / \text{корень } (n)$$

Например, если тест имеет CV 10%, необходимо провести 4 повторения, чтобы снизить его до 5%. После 6 повторений нет значительных изменений в точности, как показано ниже:



Возьмем в качестве примера ферментативное тестирование, где ожидаемое отклонение одного теста составляет  $\pm 5\%$  (в среднем):

- При 3 повторах отклонение делится на 1,732, что означает, что оно немного ниже 2 Sd. При однократном отклонении  $\pm 5\%$  оно снижается до  $\pm 3\%$ .
- При 4-х повторностях отклонение делится на 2. При однократном отклонении  $\pm 5\%$  снижает его до  $\pm 2,5\%$ .
- Если лаборатория хочет уменьшить отклонение до 1x Sd (по сравнению с 3x Sd для одного измерения), необходимо провести 9 повторений. При однократном отклонении  $\pm 5\%$  она снижается до  $\pm 1,7\%$ .

## 2 ТЕСТ-СИСТЕМЫ И ПРИЛОЖЕНИЯ (В АЛФАВИТНОМ ПОРЯДКЕ)

### 2.1 УКСУСНАЯ КИСЛОТА (E8226)

#### 2.1.1 Почему вы выбрали этот ферментативный путь с ADP-НКР?

Принцип тестирования следующий:

(1) Ацетат + АТФ — АК → Ацетил фосфат + АДФ

Концентрация АДФ эквимолярна концентрации ацетата, поэтому она является ограничивающим фактором для следующих стадий 2 и 3.

(2) АДФ + D-Глюкоза — АДФ-НКР → D-Глюкоза-6-фосфат (G6P) + АМФ

Избыток D-глюкозы в кювете, она присутствует в буфере и в некоторых образцах. Но гексокиназа является АДФ-зависимой (АДФ-ГКП, КФ 2.7.1.147), поэтому она может реагировать с глюкозой только при наличии одной молекулы АДФ. Остальная часть присутствующей глюкозы не будет реагировать.

(3) D-Глюкоза-6-фосфат + НАД<sup>+</sup> — G6P-ДН → 6-Фосфоглюконо-δ-лактон + НАДН + Н<sup>+</sup>

Этот шаг такой же, как и в обычном анализе глюкозы. При объединении всех трех стадий получается эквимолярная реакция Ацетат → АДФ → G6P → НАДН.

Мы специально выбрали этот ферментативный путь с АДФ по сравнению с пируватным путем, который выбрали многие конкуренты, по следующим причинам:

– Тестовый сигнал имеет возрастающее направление (от НАД к НАДН), поэтому можно достичь высокого диапазона измерений. Действительно, с помощью калибровочной кривой можно достичь ΔА от 1,5 до 2,0, поскольку количество НАД в буфере не ограничено. Это позволяет тестировать до 1,3 г/л, что позволяет охватить более 99% образцов вина без ступеней разбавления. Путь пирувата уменьшается (от НАДН к НАД), поэтому количество НАДН в буфере ограничено, что уменьшает диапазон измерений. Вы можете улучшить диапазон измерения пути пирувата, уменьшив объем образца, но это дает плохую чувствительность и воспроизводимость. Путь ADP обеспечивает одновременно высокую чувствительность, широкий диапазон измерения и высокую воспроизводимость.

– Отсутствует влияние пирувата, который может присутствовать в некоторых образцах

### 2.2 АММИАК (E 8390)

#### 2.2.1 Какую пробоподготовку вы рекомендуете?

Для тестов на аммиак (Roche, E-Liquid, др.) метод Карреза не допускается, так как приводит к занижению результатов. Вместо этого рекомендуется использовать хлорную кислоту или трихлоруксусную кислоту. Общие методы доступны по запросу. Вот два примера протоколов, которые мы использовали во время проверки.

##### а.) Хлорная кислота

- Взвесить ок. 5 г образца в химический стакан (запишите вес до 3-й цифры)
- Добавьте + 20 мл хлорной кислоты (1 М) и быстро перемешайте (1 мин)
- Добавьте ок. 40 мл воды, добавить магнитную мешалку и перемешивать 20 мин.
- Нейтрализовать КОН (сначала примерно 3,5 мл КОН 5М, затем КОН 1М)
- Количественно перелить в мерную колбу вместимостью 100 мл (стакан несколько раз промыть) и добавить H<sub>2</sub>O до метки.
- Оставить на 20 мин в холодильнике для снятия жирового слоя
- Фильтровать (выбросить первый мл из фильтра)
- Используйте слегка опалесцирующий образец для теста

##### б.) Метод ТСА для молока

Для тестирования аммиака в молоке мы в основном следуем методу, описанному Roche. Однако мы заметили, что метод работает и без этапа нейтрализации, поэтому значительно экономит время и снижает коэффициент разбавления:

- Смешать 1 мл Milch и 4 мл трихлоруксусной кислоты (0,3 М)
- Кратковременно встряхните, затем оставьте на 5 мин.
- Центрифугирование образца (3 мин, 4000 об/мин)
- Используйте супернатант в тесте (без рН-нейтрализации) и используйте коэффициент разбавления 5 для расчета.

### &"&" Включена ли в состав реагента система осветления?

В составе реагентов нет системы осветления молока, как это было в наборе Enzytec uid (E5390). ест можно проводить с молоком, разбавленным 1:10, как это было с E5390, но концентрация в молоке настолько мала, что результат не поддается измерению. По этой причине мы рекомендуем описанный выше метод СА с разведением 1:5.

### &" ЭТАНОЛ ~~ƒD~~, ' (\$L'

#### &" % Как производится расчет между этанолом в г/л и % (ABV)?

Процент алкоголя ( ) всегда выражается по объему ( об./об.):

- На этикетках бутылок для вина или пива указывается % об. или иногда % ABV (алкоголь по объему)
- В химии пишут % v/v (объем на объем), что означает мл/100 мл. Для сахаров или кислот процентное содержание должно быть указано в весе на объем = г/100 мл (% вес/объем) или в весе на вес = г/100 г (% вес/вес).

Вернемся к этанолу, концентрация 1 % об. = 1 мл / 100 мл = 10 мл/л. Поскольку плотность этанола составляет 0,78924 г/мл, получается 7,8924 г/л этанола.

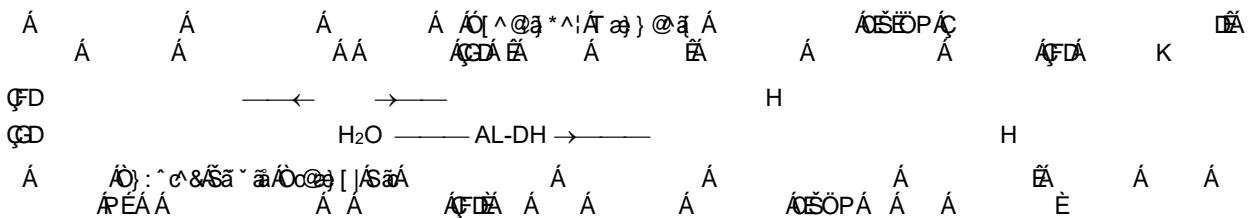
Когда результаты получены в г/л с помощью ферментативного теста, расчет выполняется наоборот:

– Если результат = 1 г/л = 1 / 0,789 (мл/л) = 1 / (10 x 0,789) в мл / 100 мл (% по объему) = 1 / 7,8924 = 0,1267 мл/100 мл (% по объему)

Таким образом, общая формула преобразования в ту или иную сторону выглядит следующим образом:

- Процент алкоголя (% об./об.) = результат теста (г/л) / 7,8924
- или Результат теста (г/л) = процентное содержание спирта (% об./об.) x 7,8924

### &" "& Почему в наборе для этанола нет AL-DH?



### &" " Почему эти реагенты не подходят для алкогольных напитков?

The text discusses the limitations of the reagents for alcoholic beverages. It notes that the reagents are designed for specific concentrations and conditions, which may not be suitable for the complex matrix of alcoholic drinks. The text is partially obscured by a large watermark.

Кроме того, реагенты Enzytec Liquid Ethanol также чувствительны к загрязнению этанолом в воздухе, поскольку НАД и АДГ находятся в одном реагенте (R2), поэтому они могут реагировать, если некоторое количество этанола поступает в реагент R2 из воздуха. Чтобы свести к минимуму это загрязнение, можно использовать следующие приемы:

- не используйте сразу полную пробирку или флакон R2, а берите только необходимое для цикла количество в отдельной пробирке
- закройте флакон R2, как только будет выполнен этап пипетирования
- выполнять новую калибровку каждый день

### 2.3.4 Почему обязательна температура 20-25°C?

Поскольку этанол обладает высокой летучестью, все инкубации следует проводить при комнатной температуре, максимально допустимой является 25 °С. Также рекомендуется закрывать кюветы парафильмом на этапах инкубации.

### 2.3.5 Как следует измерять стандарт E5420?

Стандартный жидкий этанол Enzytec (E5420) нельзя тестировать напрямую:

- Объем образца составляет 100 мкл, как описано в IFU.
- Но диапазон измерения 0 – 300 мг/л, а стандарт E5420 – 500 мг/л.
- Мы не рекомендуем предварительно разбавлять стандарт, а разводить его непосредственно в кювете (50 мкл стандарта + 50 мкл воды)

Также можно использовать другой контроль, который будет находиться в диапазоне измерений без разведений (продается Sigma):

E-035	Церилиант, этанол 25 (25 мг/дл) = 250 мг/л
E-040	Церилиант, этанол 10 (10 мг/дл) = 100 мг/л
E-110	Церилиант, этанол 5 (5 мг/дл) = 50 мг/л

### 2.3.6 Как должны быть подготовлены образцы с высоким содержанием этанола?

Образцы с высокой концентрацией (вино, сидр и т. д.) необходимо сильно разбавлять, начиная с 1:1000 и более. Чтобы убедиться, что разведение 1:1000 не содержит ошибок, следуйте этим инструкциям:

- Используйте мерную колбу, в первую очередь колбу на 500 или 1000 мл, чтобы убедиться, что измеренный объем правильный
- Используйте достаточно большой объем пробы (0,500 или 1,00 мл), чтобы уменьшить ошибки пипетирования.
- Если возможно, используйте стеклянную пипетку, чтобы обеспечить очень безопасное измерение объема.
- Пипетировать пробу в предварительно наполненную мерную колбу (примерно 90% от 250 или 500 мл) под ватерлинией и долить до метки
- Измерение в безалкогольной атмосфере

Вообще говоря, не рекомендуется использовать ферментный набор для измерения этанола в высококонцентрированных образцах, таких как вино, и практически невозможно в винных лабораториях, где тестируется большое количество образцов вина.

## 2.4 D- ИЛИ L-МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА

### 2.4.1 Почему набор D-молочной кислоты (E5120) не заменен похожим?

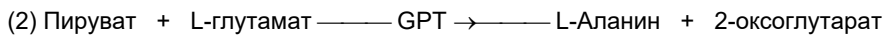
Набор Enzytec Fluid D-Lactic acid (E5240) был заменен набором Enzytec Liquid D/L-Lactic (E8240) без дифференциации для двух кислот:

- Если дифференциация не нужна, это экономит дополнительный тест и деньги, потому что набор L-Lactic E5260 больше не нужен. Например, это касается большинства производителей фруктовых соков, так что это преимущество.
- Если необходима дифференциация, необходимо купить набор Enzytec Liquid L-молочная кислота (E5260) и нарастить разницу. Но это не дороже предыдущей ситуации, когда нужно было купить Enzytec Fluid D-Lactic (E5240) плюс Enzytec Fluid L-lactic (E5260) и сделать их сумму.

Таким образом, новая комбинация Enzytec Liquid D/L-Lactic (E5240) и Enzytec Fluid L-Lactic (E5260) экономит время и деньги лабораторий по сравнению с предыдущей ситуацией.

## 2.4.2 Почему в наборе для L-молочной кислоты нет GPT, но есть гидразин?

В наборе Roche L-Lactic присутствует фермент GPT для удаления пирувата (2) и, таким образом, смещения реакции (1) вправо:



Но также возможно сместить реакцию 1 вправо следующими способами:

- настройка буфера и добавление специального соединения (та же функция, что и у гидразина для улавливания пирувата),
- использование L-ЛДГ и НАД<sup>+</sup> в более высокой концентрации для достижения лучшей константы Михаэлиса.

Набор Enzytes Liquid сочетает в себе эти 3 элемента (L-ЛДГ, НАД<sup>+</sup> и буфер), чтобы придать тесту более высокое качество по сравнению с классическими наборами: более высокая константа Михаэлиса, сокращение времени реакции до 10 минут и стабильность реагента в жидкой форме. По этим причинам наличие GPT не обязательно. Нет ни Гидразина (который ядовит), чтобы сместить реакцию вправо, потому что состав набора позволяет такое смещение само по себе.

Пируват и НАДН находятся в более стабильном энергетическом состоянии, чем лактат и НАД<sup>+</sup>. Таким образом, энергия не требуется (например, из АТФ), реакция идет одна слева направо.

## 2.4.3 Почему получилось очень низкое значение для холостой пробы?

Сильный бланк реагента является нормальным, это связано с составом R2. Точный список соединений, входящих в состав R2, не может быть раскрыт, поскольку это конфиденциальная информация.

Бланк реагента вычитается для каждого запуска в ручном приложении. Он также вычитается из калибровочной кривой при использовании автоматизированных систем. Таким образом, в целом высокий бланк реагента не влияет на результаты.

## 2.4.4 Почему у реагентов сильный запах?

Реагент R1 имеет сильный запах, похожий на аммиак (азот). Этот сильный запах является нормальным, это связано с составом R1. Точный список соединений, которые включены, не может быть раскрыт, поскольку это конфиденциальная информация.

При использовании в автоматизированных системах этот реагент R1 может загрязнить иглу для определения альфа-амминового азота. Чтобы избежать этого загрязнения, мы рекомендуем запрограммировать этап промывки иглы 0,2 М HCl. Большинство автоматизированных систем допускают такой этап промывки. В противном случае рекомендуется не тестировать молочную кислоту и альфа-аминоазот одновременно.

## 2.5 ЛАКТОЗА / ГАЛАКТОЗА (E8110 + E8120)

### 2.5.1 Какие наборы нужны и для какого количества тестов?

Принцип тестирования лактозы/галактозы точно такой же, как и для набора Roche:

- В первом тесте лактоза/галактоза (E8110) измеряются оба сахара
- Во втором тесте Галактоза (E8120) измеряется только свободная Галактоза
- Разница между обоими результатами дает концентрацию лактозы

Но так как разница делается с результатами в г/л, то ее необходимо вычесть с учетом коэффициента 1,9 между молекулярными массами:

$$C_{\text{Лактоза}} [\text{g/l}] = C_{\text{Лактоза/галактоза}} - 1.90 \times C_{\text{Галактоза}}$$

Пример:

Лактоза/D-Галактоза (E8110) 1.500 г/л

D-Галактоза (E8120) 0.400 г/л

Лактоза = 1.500 г/л – 1.90 x 0.400 г/л = 0.740 г/л

Логистика, количество тестов и расчет цены также отличаются от Roche:

- с набором «Рош» 16 тестов на лактозу/галактозу и 16 тестов на галактозу в одном наборе



- с наборами E-Liquid необходимо купить два набора по 50 тестов в каждом (E8110 и E8120)
- цену Roche необходимо разделить на 16 тестов, а цену E-Liquid E8110+E8120 на 50 тестов

## 2.5.2 Какие средства контроля качества вы рекомендуете для лактозы?

Мы рекомендуем использовать Enzytec Sugar Standard E1242 в качестве контроля качества, потому что он у нас есть, поэтому мы можем повторить те же испытания в Германии.

Для некоторых стран проще купить у Sigma (VWR), поэтому также можно купить лактозу и подготовить пробу для контроля качества в лаборатории, например:

- Моногидрат лактозы VWR № 1.07660.0250
- Моногидрат D-лактозы Sigma Bio-Ultra (№ 61339-25G > 99,5%)
- β-Лактоза Sigma N° L3750 (≤30% α-аномерной основы, ≥99% общей лактозы)
- Моногидрат α-лактозы № L3625 (≥99% общей лактозы)

При использовании моногидрата лактозы необходимо учитывать молекулярные массы лактозы (342,3 г/моль) и моногидрата лактозы (360,32 г/моль), поэтому коэффициент пересчета составляет 0,950. Это означает, что 1,0526 г лактозы.Н<sub>2</sub>О эквивалентны 1 г лактозы или что 1 г лактозы. Н<sub>2</sub>О = 0,950 г лактозы.

Но сахара очень гигроскопичны, поэтому эти стандарты будут иметь ограниченный срок хранения после того, как они будут открыты. По этой причине мы рекомендуем использовать готовые к использованию стандарты, такие как:

- E1242 от R-Biopharm (жидкий, готовый к использованию)
- Merck/Sigma 72622-50ML, TraceCERT®, 1000 мг/л в воде (жидкий, готовый к использованию)
- Аналитические стандарты, такие как 47287-U, PHR1025 или PHR1024 от Merck/Sigma, которые не слишком дороги (масса порошка известна, необходимо добавлять воду)

## 2.5.3 Какие средства контроля качества вы рекомендуете для галактозы?

Для D-галактозы можно использовать порошок D-галактозы, например, из VWR 1.04058.0025 или Sigma A1131.0100. Однако сахара очень гигроскопичны, поэтому также возможно, что взвешенный порошок содержит некоторое количество воды, и поэтому целевое значение неверно.

Кроме того, каждые 6 месяцев мы отслеживаем стабильность каждой партии на нашем складе. Делая это, мы заметили восстановление только 50-60% восстановления со старыми контролями. Поэтому мы повторили тестирование со свежеприготовленными стандартами галактозы, и восстановление вернулось к норме. Возможно, сахар прилипает к пластиковой или стеклянной стенке, но мы не знаем наверняка.

Поэтому мы настоятельно рекомендуем использовать готовые стандарты. У нас их нет в R-Биофарм, но они есть, например, в Мерке:

- Merck/Sigma 72637-50ML, TraceCERT®, 1000 мг/л в воде (жидкий, готовый к использованию)

## 2.5.4 Нормально ли видеть белый осадок в R2?

При получении партии реагенты фильтруют, но через некоторое время может появиться рыхлый осадок. Каждые 6 месяцев партии проверяются нашим отделом контроля качества, и в результате спецификации выполняются, даже если этот осадок виден. Так что при ручном использовании об этом можно не беспокоиться.

При использовании автоматизации эти пушистые осадки могут попасть в иглу и затруднить этап пипетирования. По этой причине мы рекомендуем фильтровать реагент при заливке его во флаконы прибора. Пожалуйста, положите воронку и фильтровальную бумагу на флакон и пролейте через него реагент. Это потребует двух дополнительных минут работы, но сделает будущие забеги более безопасными.

Для фильтрации используйте обычный фильтр с размером частиц 10–14 мкм (например, фильтр Whatman Grade 1). Было бы достаточно использовать фильтр с предварительным размером 25 мкм. Пожалуйста, не используйте шприцевые фильтры с размером частиц 0,45 мкм. Пожалуйста, фильтруйте одну бутылку R2 только один раз, не фильтруйте ее дважды.

Если наблюдается низкое извлечение, проблема может иметь другую причину, чем рыхлый осадок в R2. Перед фильтрацией R2 попробуйте внести следующие изменения:

- Увеличьте первое время инкубации (плюс 5 минут к обычному времени) и проверьте результаты. Если результаты улучшаются, это означает, что проблема связана с R1 ( $\beta$ -галактозидаза). Если результаты не улучшаются, верните время инкубации к норме.
- Увеличьте второе время инкубации (плюс 5 мин к обычному времени) и проверьте результаты. Если результаты улучшатся, это означает, что проблема действительно в R2 и, вероятно, связана с рыхлым осадком.

## 2.6 ЛАКТОЗА / ГЛЮКОЗА (E8130 + E8140)

### 2.6.1 Какие средства контроля качества вы рекомендуете для лактозы?

Пожалуйста, смотрите ответ под тестом на лактозу/галактозу выше (E8110).

### 2.6.2 Какие наборы нужны и для какого количества тестов?

Принцип определения уровня лактозы/глюкозы точно такой же, как и для набора Roche:

- В первом тесте Лактоза/Глюкоза (E8130) измеряются оба сахара
- Во втором тесте Глюкоза (E8140) измеряется только свободная Глюкоза
- Разница между обоими результатами дает концентрацию лактозы

Но так как разница делается с результатами в г/л, то ее необходимо вычесть с учетом коэффициента 1,9 между молекулярными массами:

$$C_{\text{Лактоза}} [\text{г/л}] = C_{\text{Лактоза/Глюкоза}} - 1.90 \times C_{\text{Глюкоза}}$$

Пример:

Лактоза/D-Глюкоза (E8130) 1.500 г/л

D-Глюкоза (E8140) 0.400 г/л

Лактоза = 1.500 г/л – 1.90 x 0.400 г/л = 0.740 г/л

Логистика, количество тестов и расчет цены также отличаются от Roche:

- с набором Roche в одном наборе 32 теста на лактозу/глюкозу и 32 теста на глюкозу
- с наборами E-Liquid необходимо купить два набора по 50 тестов в каждом (E8130 и E8140)
- цену Roche необходимо разделить на 16 тестов, а цену E-Liquid E8130+E8140 на 50 тестов

### 2.6.3 Можно ли измерить лактозу в безлактозных продуктах?

Измерение безлактозных продуктов теоретически возможно, но практически затруднено из-за низких концентраций.

Обычное молоко имеет концентрацию лактозы 50 г/л. Когда образец разводится 1:50 или 1:100, как описано в методе, результирующая концентрация составляет от 0,5 до 1 г/л, что находится в середине диапазона измерения (50–3000 мг/л).

Когда лактоза удаляется ферментативно или ультрафильтрацией для производства безлактозных продуктов, эффективность составляет 99%, поэтому остаточная концентрация лактозы составляет около или ниже 0,5 г/л.

Если такой образец предварительно разбавлен 1:50 или 1:100, как описано в листке-вкладыше, концентрация будет составлять от 5 до 10 мг/л, что примерно соответствует нижнему пределу обнаружения (4 мг/л) и ниже рекомендуемый диапазон измерения (50 - 3000 мг/л). Кроме того, концентрация глюкозы может быть высокой (особенно, если лактоза гидролизована ферментативно), поэтому будет очень сложно измерить разницу между тестом на лактозу/глюкозу № 5600 и тестом на глюкозу № 5140, а также вычислить истинную лактозу. будет очень неточным. По этой причине нельзя использовать обычную процедуру с предварительным разведением 1:50.

Чтобы решить эту проблему, используйте набор для удаления глюкозы E3400.

## 2.7 САХАРА В ОБЩЕМ

### 2.7.1 Какие наборы необходимы для тестирования сахарозы, глюкозы и фруктозы?

Наборы Enzytec Liquid содержат реагенты для тестирования комбинаций сахаров без дифференциации, поэтому наборы для тестирования необходимо выбирать в соответствии с потребностями лаборатории:

- Если необходимо различать D-глюкозу и сахарозу, закажите сахарозу/глюкозу (E8180) и глюкозу (E8140), чтобы рассчитать разницу (вручную или автоматически — это одно и то же).
- Для тестирования D-глюкозы и D-фруктозы есть две возможности
  - Для ручного тестирования набор D-глюкоза/D-фруктоза (E8160) позволяет дифференцировать, поскольку доступны три реагента и можно считывать A1, A2 и A3 по отдельности.
  - Для автоматизированных систем возможны только 2 показания (A1 и A2), поэтому два сахара измеряются без различия. Дифференциация возможна только путем параллельного тестирования глюкозы/фруктозы (E8160) и глюкозы (E8140) и вычисления разницы.
- Если сумма D-глюкозы, D-фруктозы и сахарозы необходима без дифференциации, закажите E8190 (вручную или автоматически)
- Когда необходимо различать 3 сахара D-глюкозу, D-фруктозу и сахарозу, опять же есть две возможности.
  - Для ручного тестирования закажите глюкозу/фруктозу (E8160), если возможно различие глюкозы и фруктозы, и сахарозу/глюкозу (E8180) для получения сахарозы.
  - Для автоматизированного тестирования закажите глюкозу (E8140), глюкозу/фруктозу (E8160) и сахарозу/глюкозу (E8180), чтобы рассчитать 3 сахара.
- Контроль (E5440) и калибратор (E5450) всегда рекомендуются

### 2.7.2 Можно ли протестировать мальтозу с наборами E-Liquid?

Можно комбинировать фермент  $\alpha$ -люкозидазу с набором Enzytec Liquid Glucose (E8140), набором Sucrose/Glucose (E8180) или набором Sucrose/Glucose/Fructose Kit (E8190). Отличие от обычного применения заключается в том, что исходный образец гидролизует  $\alpha$ -глюкозидазой перед тестом в отдельной пробирке (например, в чашке Эппендорфа), а затем тест E-Liquid проводится в обычном режиме.

#### а.) Реагенты

Roche

Состав набора		Изменения		Объемы для ручной процедуры		Концентрации в тесте	
Виала 1:		<b>Доб. воду (мл):</b>	<b>6</b>	Образец (мл):	0,100		
$\alpha$ -глюкозидаза (ед)	210	Конц. (ед/мл):	35,00	R1 (мл):	0,200	$\alpha$ -глюкозидаза (ед/мл):	23,33

Enzytec Liquid

Цитрат буфер 100 мМ, регулировать до pH 6.0 - 6.6.

Enzyme: Sigma G0660 - 750 UN

Разбавьте фермент, чтобы получить 35 ЕД/мл.:

- |                         |   |
|-------------------------|---|
| → Глюкозида (U) 750     | Sigma G0660 - 750 UN  |
| → Цитрат буфер (мл) 2x2 | восстановить лиофилизат 2 мл и смыть еще 2 мл   |
| → Цитрат буфер (мл) 16  | Добавьте к 4 мл, чтобы достичь 20 мл  |
| → Конц. (ед/мл): 37,5   | Замораживание аликвот при температуре -20°C (каждая = 1250 мл = 6 образцов в ручном режиме) |

## b.) Процедура

Те же концентрации, что и выше, должны быть достигнуты путем добавления первой стадии инкубации перед анализом Enzytec Liquid E8190. Этого можно добиться вручную или на автоматизированных приборах, добавив первый реагент с инкубационным временем перед продолжением обычного теста:

- ручная процедура = 200 мкл раствора фермента (35 ЕД/мл) + 100 мкл образца в отдельной кювете, инкубировать 30 мин; возьмите 100 мкл образца, затем продолжите обычный тест и скорректируйте результаты с коэффициентом разбавления = 3
- автоматизированная процедура = 20 мкл раствора фермента (35 ЕД/мл) + 10 мкл образца, инкубировать 20 мин, затем продолжите обычную процедуру тестирования в той же кювете (расчет с калибровочной кривой, коррекция не требуется)

Пипетировать в кюветы:	Ручной анализ	Автоматизированный анализ
Цитратный буфер pH 6,6, $\alpha$ -глюкозидаза	0.200	0.020
<b>Растворы образцов т.е. 0,15-1,5 г мальтозы/л)</b>	0.100	0.010
	Инкубировать 20 мин при +20 to +25°C Возьмите 100 мкл образца и выполните обычный анализ Enzytec Liquid (исправьте результаты с коэффициентом 3).	Инкубировать 10 мин при 37°C Продолжите тест в той же кювете. Результаты рассчитываются по калибровочной кривой с учетом пробы объемом 10 мкл.

Ручное тестирование: если исходная концентрация мальтозы низкая, поэтому разведение 1:3 дает слабый сигнал, можно применить высокочувствительный анализ с большим объемом пробы. В этом случае пересчитайте формулы для ручной процедуры (изменяются формулы  $df$  и концентрации).

Автоматизированное тестирование: Процедура начинается с 20 мкл и 10 мкл в тестовой кювете, после чего следует 10-минутная инкубация для гидролиза. Это возможно только на сложных приборах, таких как Gallery или Arena от Thermo, или Thunderbolt от R-Biopharm, но не на каждом приборе. Если невозможно выполнить этот дополнительный шаг автоматически на вашем приборе, выполните ручную процедуру и поместите образец объемом 300 мкл на борт для дальнейшей обработки с помощью ферментативного анализа.

## c.) Обработка результатов

Результаты для мальтозы выражены молекулярной массой глюкозы (180,16 г/моль).

Тестовый набор	Вычисления
Глюкоза (E8140)	Истинная мальтоза (г/л) = Результат Мальтоза с E8140 (г/л) – Результат Глюкоза E8140 (г/л)
Сахароза (E8180)	Истинная мальтоза (г/л) = [Результат Мальтоза с E8180 (г/л) – Результат Сахароза E8180 (г/л)] / 1,9
Сахароза/Глюкоза/ Фруктоза (E8190)	Настоящая мальтоза (г/л) = полученная мальтоза с E8190 (г/л) – (минус) Результат Сахароза/Глюкоза/Фруктоза E8190 (г/л)

## 2.8 ГЛЮКОЗА/ФРУКТОЗА (E8160)

### 2.8.1 Как заменить старый набор D-фруктозы (E5120) на глюкозу/фруктозу (E8160)?

Тест-набор Enzytec Fluid Fructose (E5120) не был заменен эквивалентным продуктом Enzytec Liquid. Вместо этого мы рекомендуем использовать тест Enzytec Liquid Glucose/Fructose Assay (E8160). Этот тест будет использоваться в основном для оценки концентрации общего содержания глюкозы/фруктозы без дифференциации. Но если необходима дифференциация, есть три возможности.

- При работе вручную приложение от ИФУ указывает, что сначала измеряется D-Глюкоза (A2 – A1), затем D-Фруктоза (A3 – A2). Некоторые автоматизированные приборы также позволяют измерять 3 оптические плотности и вычислять различия, например, анализаторы Cobas.
- При использовании автоматизированной системы также можно сначала дать D-глюкозе прореагировать в течение 10 мин при 37°C. Первую оптическую плотность (A1) измеряют через эти 10 мин, до добавления реагента 3 (PGI для реакции с фруктозой). Должна быть проведена вторая инкубация в течение 10 мин, и в конце измеряется A2. Разница A2 – A1 дает концентрацию фруктозы, так как D-глюкоза уже прореагировала раньше. Такое программирование возможно на приборах, допускающих 2 длительных периода инкубации (например, Arena, Gallery, ChemWell, Thunderbolt и т. д.), но не на каждом клиническом анализаторе, когда возможна только одна инкубация.
- Третья возможность заключается в измерении суммы D-глюкозы/D-фруктозы с помощью набора E8160, содержания D-глюкозы с помощью E8140 и расчете разницы для наличия D-фруктозы. Этот вид дифференциального тестирования является обычной практикой в ферментативном тестировании, например, при тестировании сахарозы/глюкозы. Это можно автоматизировать на любом анализаторе через «расчетные

результаты», поэтому и тесты, и расчет выполняются автоматически. Это означает, что необходимы 2 тест-набора, но это также имело место в прошлом при использовании Enzytec Fluid D-Fructose (E5120) плюс D-Fructose (E5140) и суммировании обоих результатов. Теперь мы не складываем 2 результата, а делаем разницу.

По этой причине нет необходимости в отдельном тесте на D-фруктозу, подобно прежнему тесту E5120. Того же результата можно добиться и с E8160, поэтому мы остановились на E5120.

## 2.9 САХАРОЗА/ГЛЮКОЗА (E8180)

### 2.9.1 Как производится расчет?

Есть 3 возможности выразить результаты по сахарозе (см. примеры под а/б):

- Химики выражают результаты в моль/л. Если присутствует глюкоза, она даст правильный результат (моль/л).
- Для Enzytec Liquid мы выражаем концентрацию теста E8180 молекулярной массой сахарозы. Сахароза измеряется правильно, но если в образце присутствует и глюкоза, то она завышена в 1,9 раза. Следовательно, результат глюкозы E8140 (г/л) необходимо умножить на 1,9, прежде чем вычесть его из «общей сахарозы».
- Некоторые компании калибруют анализы сахарозы/глюкозы по молекулярной массе глюкозы. Сахароза занижена, но свободная глюкоза измеряется правильно. Для расчета 2 результата вычитаются, а затем эта разница умножается на 1,9.

#### а.) Расчет с молекулярной массой сахарозы («Общий сахар»)

Мы выбрали расчет с молекулярной массой сахарозы, потому что это позволяет измерять сахарозу напрямую, если глюкоза отсутствует. Если присутствует D-глюкоза, она завышена в 1,9 раза, так как используется молекулярная масса сахарозы. Следовательно, его необходимо измерять отдельно с помощью анализа уровня глюкозы в жидкости Enzytec (E8140), а также умножать на коэффициент 1,9 перед вычитанием, как поясняется в IFU:

$$\text{Сахароза (г/л)} = \text{Сахароза/Глюкоза E8180 (г/л как сахароза)} - [1.9 \times \text{D-Глюкоза E8140 (г/л)}]$$

*Пример:*

$$\text{Общий-Сахар (E8180)} = 1.500 \text{ г/л}$$

$$\text{D-Глюкоза (E8140)} = 0.400 \text{ г/л}$$

$$\text{Сахароза} = 1.500 \text{ г/л} - 1.90 \times 0.400 \text{ г/л} = 0.740 \text{ г/л}$$

#### б.) Расчет с молекулярной массой глюкозы («Общая глюкоза»)

При использовании автоматизированной системы также можно калибровать анализ Sucrose/Glucose E8180 по глюкозе. В этом случае свободная D-глюкоза измеряется правильно, но сахароза занижается в 1,9 раза. Для дифференциации обоих сахаров расчет будет следующим:

$$\text{Сахароза (г/л)} = 1.9 \times [\text{Сахароза/Глюкоза E8180 (г/л как глюкоза)} - \text{D-Глюкоза E8140 (г/л)}]$$

*Пример:*

$$\text{Общая глюкоза (E8180)} = 0.790 \text{ г/л (тот же образец, что и выше, но}$$

$$\text{калиброванный по глюкозе) D-Глюкоза (E8140)} = 0.400 \text{ г/л}$$

$$\text{Сахароза} = 1.9 \times [0.790 \text{ г/л} - 1.90 \text{ г/л}] = 0.740 \text{ г/л}$$

## 2.10 САХАРОЗА/ГЛЮКОЗА/ФРУКТОЗА (E8190)

### 2.10.1 Можно ли различить 3 сахара?

Набор E8190 — это специальный набор, которого нет у Roche. Он экономит время и деньги для тех клиентов, которым нужна только сумма трех сахаров без дифференциации.

Если вы хотите дифференцировать три сахара, вам нужно действовать следующим образом.

а.) При ручном тестировании вам необходимо заказать E8160 и E8180 и у вас будет 3 сахара:

- E8180 даст сумму сахарозы/глюкозы. Сахароза = E8180 – 1,9 \* глюкоза (от E8160)
- E8160 будет выдавать глюкозу и фруктозу один за другим

Это то же самое, что и с анализом Roche Сахароза/Глюкоза/Фруктоза (10716260035), где вам также понадобятся две кюветы. Разница лишь в том, что для Roche все реагенты находятся в одном наборе, тогда как для E-Liquid требуется два набора.

b.) При работе на автоматизированной системе нельзя измерять Глюкозу и Фруктозу один за другим, поэтому необходимы три теста:

- E8180 даст сумму сахарозы/глюкозы. Сахароза = E8180 – 1,9 \* E8140
- E8160 дает глюкозу и фруктозу без дифференциации. Фруктоза = E8160 – E8140
- E8140 даст глюкозу

### 2.10.2 Почему вы используете название «Общий сахар» и что оно означает?

Очевидно, что набор не измеряет все сахара, присутствующие в образце, но он измеряет сумму трех сахаров: сахарозы, D-глюкозы и D-фруктозы. Для многих областей, таких как винодельческая промышленность, это значимые сахара в производственном процессе, поэтому они называют эту сумму «всего сахара» (другие сахара для них не важны).

Во время первой инкубации сахароза (342,16 г/моль) гидролизует на D-глюкозу и D-фруктозу (180,16 г/моль). Оба будут реагировать в тесте, поэтому концентрация сахарозы дана с молекулярной массой глюкозы + фруктозы (2 x 180,16 = 360,32 г/моль). Ошибка составляет 360,12/342,16, поэтому концентрация сахарозы завышена в 105,2%. Свободная D-глюкоза и D-фруктоза в образце измеряются правильно.

Однако наблюдается небольшое завышение концентрации сахарозы: поскольку при гидролизе добавляется молекула воды, молекулярная масса сахарозы (342,16 г/моль) несколько ниже, чем молекулярная масса глюкозы + фруктозы (2 x 180,16 = 360,32 г/моль). Ошибка составляет 360,12/342,16, поэтому концентрация сахарозы завышена в 105,2%. Свободная D-глюкоза и D-фруктоза в образце измеряются правильно.

Например, если тестируется стандартный раствор, подобный Enzytec Sugar Standard manual (E5440), который содержит 0,500 г/л каждого сахара, результат теста будет следующим:

$$D\text{-глюкоза (0,5 г/л) + D-фруктоза (0,5 г/л) + сахароза (1,052 x 0,5 г/л) = 1,526 г/л}$$

### 2.10.3 Какова токсичность имидазольного буфера?

В нашем паспорте безопасности есть предупреждение относительно имидазольного буфера (R2). Из-за свойств репродуктивной токсичности применяется достаточно строгое ограничение в 0,3% для классификации смесей, содержащих имидазол. Это означает, что только при концентрации имидазола менее 0,3% маркировка символами опасности не требуется, если в буфере нет других опасных веществ.

Следует учитывать количество имидазола в тест-системе:

- Токсичность имидазола низкая, на что указывает LD50 970 мг/кг.
- Рассмотрим стройного человека-лаборанта массой тела 50 кг. Для этого человека токсикологическая ЛД50 имидазола составляет 50 кг \* 0,97 г/кг = 48,5 г имидазола.
- У нас около 17 г имидазола на литр реагента R2. R2 = 48,5 г/17 г/л = 2,85 л R2. С 26 мл R2 в комплекте: 2850 мл / 26 мл/набор = 109 комплектов.
- Имидазол не летуч и не токсичен при вдыхании. Это означает, что для приема токсического уровня имидазола человек с массой тела 50 кг должен выпить (!) полное содержание R2 из 109 наборов E8190.
- Обычно лаборанты носят перчатки, лабораторные халаты и защитные очки. Кроме того, у них есть образование по обращению с химикатами. В этом случае риск просто нулевой, даже с предупреждением в паспорте безопасности.

### 2.10.4 Почему необходимо корректировать сахарозу с коэффициентом 1,053?

При использовании ферментативного метода сахарозу измеряют с помощью реакции с глюкозой, поэтому ее рассчитывают по молекулярной массе глюкозы (180,16 г/моль). Однако молекулярная масса сахарозы составляет 342,3 г/моль, а при гидролизе на глюкозу и фруктозу ее общая масса составляет 2 x 180,16 г/моль = 360,32 г/моль. Причина в том, что молекула воды была добавлена с 18,16 г/моль, поэтому общий вес выше.

Таким образом, значение сахарозы завышено в 1,053 раза, что представляет собой отношение ММ сахарозы до гидролиза (342,3 г/моль) и после гидролиза (360,32 г/моль). Значения глюкозы и фруктозы правильные. Это означает, что:

- Если анализируется образец с чистой сахарозой, значение теста необходимо разделить на 1,053, чтобы получить истинную концентрацию сахарозы.



- Если анализируется образец с определенной концентрацией глюкозы/фруктозы/сахарозы, значение, полученное в ходе теста, будет завышено для сахарозной части (результат = глюкоза + фруктоза + 1,053 x сахароза). Например, при использовании контроля качества E5440 по 0,500 г/л результат теста E8190 будет  $0,500 + 0,500 + (1,053 \times 0,500) = 1,526$  г/л.
- Если соотношение Глюкоза/Фруктоза/Сахароза неизвестно, сахарозная часть завышена в 1,053 раза, но исправить результат невозможно.

## 2.11 ОБЩИЙ СУЛЬФИТ (SO<sub>2</sub> С E8600 И E8610)

### 2.11.1 Какой принцип используется?

Enzytec Liquid SO<sub>2</sub>-Total (E8600) и Enzytec Liquid SO<sub>2</sub>-Free (E8610) представляют собой хромогенные реакции, в которых SO<sub>2</sub> вступает в реакцию с хромогенным веществом и вызывает изменение оптической плотности при 340 нм. В реакции не участвует фермент. Хромоген одинаковый для обоих анализов, но это частная информация R-Biopharm. Поскольку хромоген не может быть запатентован, мы не можем раскрывать состав.

Реакция может быть представлена следующей химической реакцией:



Разница между двумя тестами связана с pH и составом буфера:

- Для Enzytec Liquid SO<sub>2</sub>-общий (E8600) буфер и pH (щелочной) оптимизированы для высвобождения связанного SO<sub>2</sub>
- Для Enzytec Liquid SO<sub>2</sub>-свободный (E8610) буфер и pH (кислота) не высвобождают связанный SO<sub>2</sub>

Тесты у конкурентов отличаются:

- Для отсутствия SO<sub>2</sub> они используют парарозанилин (фуксин), альдегид при pH 2,0 и измерении при 575 нм.
- Для общего количества SO<sub>2</sub> они используют дитиобиснитробензойную кислоту (DTNB) и измеряют при 405 или 420 нм.

Преимущество работы с длиной волны 340 нм, как мы делаем в R-Biopharm, заключается в устранении помех от цвета образца и во избежание использования токсичных альдегидных реагентов.

### 2.11.2 Почему набор не работает с законом Ламберта-Бера?

Поглощение, измеренное для образцов, не может быть преобразовано в соответствующие концентрации с использованием формулы Ламберта-Бера, поскольку коэффициент экстинкции хромогена неизвестен. По этой причине тест должен быть откалиброван с использованием стандарта, который содержит точно 150 мг/л SO<sub>2</sub> (включено).

Оптическая плотность, измеренная для образца, устанавливается по отношению к стандарту и позволяет (пропорционально) рассчитать его концентрацию. А так как концентрация калибратора 150 мг/л, то формула расчета следующая:

$$\text{Собразец [мг/л]} = 150 \times (\Delta A_{\text{образец}} / \Delta A_{\text{калибратор}})$$

Эта процедура эквивалентна калибровочной кривой, которая также возможна:

- холостая проба воды является нулевой точкой градуировочной кривой (и она вычитается из всех образцы)
- калибратором является вторая точка калибровочной кривой.

Таким образом, мы могли бы использовать калибровочную кривую, идущую от нуля до калибратора 150 мг/л, результат был бы точно таким же. Мы подумали, что проще сделать простой расчет

$$\text{Собразец [мг/л]} = 150 \times (\Delta A_{\text{образец}} / \Delta A_{\text{калибратор}}).$$

### 2.11.3 Почему обработка проб очень важна для SO<sub>2</sub>?

#### а.) Пробоподготовка

Это общее утверждение, подготовка проб оказывает сильное влияние на результаты. Но для SO<sub>2</sub> это особенно верно, потому что SO<sub>2</sub> быстро разрушается во время пробоподготовки путем окисления и испарения. Поскольку концентрации низкие, малейшая разница в подготовке проб приводит к большим различиям в результатах.



Худшим случаем был запрос относительно  $\text{SO}_2$  в гамбургере: хлеб, масло, мясо, лук, помидоры, сыр, соус и т. д., у каждого из них разная концентрация  $\text{SO}_2$ . Как каждая лаборатория измельчает образец и следит за тем, чтобы все было хорошо перемешано и что обработанный образец действительно репрезентативен для всего образца? И как сделать так, чтобы  $\text{SO}_2$  не разрушался в процессе помола?

Существуют разные возможности для сравнения идентичных образцов по  $\text{SO}_2$ .

#### Образцы тестируются в лаборатории

Это самая простая ситуация, пробоподготовка выполняется в лаборатории, и этот же образец тестируется параллельно с Enzytec Liquid и установленным методом. В этом случае убедитесь, что образцы тестируются параллельно в течение одного часа во избежание окисления.

#### Образцы тестируются во внешней лаборатории

Если образцы отправляются во внешнюю лабораторию, сравнение будет затруднено:

- Ваша лаборатория должна отправить нативный образец, а также образец после подготовки в вашей лаборатории. Это прекрасно работает для сахара или кислот, потому что они стабильны, но для  $\text{SO}_2$  это сложно, так как приготовленный образец нестабилен. Если возможно, заморозьте или охладите 2 образца для отправки и отправьте их экспресс-доставкой.
- Второй вариант – обратиться во внешнюю лабораторию, если она достаточно близка к вашей, и провести там тесты Enzytec Liquid, пока лаборатория выполняет метод сравнения с теми же образцами.

#### **b.) Обработка образцов**

Второй момент, который необходимо проверить, — это способ обращения с образцами. Поскольку свободный  $\text{SO}_2$  летуч, после открытия флакона он скапливается на поверхности вина. При йодометрическом титровании используют от 10 до 25 мл вина, чтобы объем был репрезентативным для всей пробы. Но при колориметрическом тесте откапывают только 100 мкл, обычно с поверхности жидкости, где скапливается  $\text{SO}_2$ . Поэтому мы рекомендуем следующий порядок действий:

- перелить большую пробу вина в закрытую пробирку, почти не оставив воздуха над жидкостью (9,7 мл в пробирке на 10 мл или 49,5 мл в пробирке на 50 мл). Будьте осторожны, чтобы не взбалтывать вино при переносе образца (без смешивания воздуха).
- очень осторожно перемешайте образец (без смешивания воздуха)
- открыть пробирку и пипетировать 100 мкл, максимально погрузив наконечник пипетки в пробу вина (желтый наконечник = 2 – 3 см в вино).

Если используется автоматизированная система, ситуация более критична:

- Не используйте детские чашки с большим соотношением поверхности и объема (происходит сильное окисление/испарение). Вместо этого, пожалуйста, используйте тубик на 6 мл и наполните его как можно больше.
- Не оставляйте образцы на приборе на несколько часов, а проверяйте их на содержание  $\text{SO}_2$  как можно скорее, когда они находятся на поверхности.

#### **2.11.4 Как должны быть подготовлены стандарты и образцы, чтобы они были стабильными?**

$\text{SO}_3$  быстро окисляется до  $\text{SO}_4$  во время приготовления стандартов или образцов. Во избежание этого необходимо подготовить стандарты или образцы в соответствии с инструкциями, описанными ниже.

#### **a.) Качество воды**

Важно использовать бидистиллированную воду без окислительно-восстановительного потенциала. По этой причине рекомендуется обрабатывать воду активированным углем (набор Roche, но также подходит для Enzytec Liquid):

##### **Важная заметка**

*Используйте только свежепереваренный. воды для анализа или обработайте деминерализованную воду активированным углем (например, 1 г/100 мл): смешайте уголь с водой при перемешивании. Фильтровать через ок. 3 мин. Также можно использовать бентонит.*

#### **b.) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ or $\text{Na}_2\text{SO}_3$**

Вообще говоря, мы рекомендуем использовать метабисульфит калия ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , также называемый пиросульфитом калия) или метабисульфит натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), поскольку они более стабильны, чем соответствующие сульфитные формы ( $\text{K}_2\text{SO}_3$  или  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ).

Мы используем следующий протокол:

- Метабисульфит натрия от Sigma ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ; каталожный номер S9000-500g)
- поставить пластиковую пробирку 10 мл на высокоточные весы и сделать контрольную (вес = ноль)
- масса точно 44,5 мг метабисульфита натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) непосредственно в пробирке, что эквивалентно 3 г/л  $\text{SO}_2$  (также можно использовать 59,0 мг  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , но он менее стабилен)
- добавить 10 мл охлажденной воды (объемом соли пренебрегаем) и растворить соль легким встряхиванием (не подмешивая в воду кислород); вместо воды мы рекомендуем использовать лимонную кислоту или метафосфорную кислоту (см. ниже)

– разбавить точно до 1:10, чтобы получить 300 мг/л SO<sub>2</sub>, снова лимонной кислотой или метафосфорной кислотой

Даже в этих условиях мы рекомендуем держать стандарт только в течение одного дня.

### с.) Защита SO<sub>3</sub> от окисления

Когда стандарты или образцы готовятся в воде, окисление может происходить даже при хорошем качестве воды. Было использовано и/или опубликовано несколько методов защиты SO<sub>3</sub> от окисления, которые можно использовать либо для стандартного разбавления, либо для экстракции пробы водой.

Ацетальдегид	<p>В более старой версии сульфитного вкладыша от Boehringer Mannheim, датированной 1995 годом, была дана следующая рекомендация:</p> <p><b>Приготовление стандартного раствора сульфита</b>  <i>Точно вес ок. 60 мг Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> или 45 мг дисульфита натрия (A.R.) в химический стакан, растворить в 50 мл свежедистиллированной воды, содержащей прибл. 100 мг ацетальдегида (примерно 100 мкл) и pH доводят до 3,0 добавлением HCl (0,01 моль/л). Количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, дополняют свежедистиллированной водой до метки и перемешивают. Готовят стандартный раствор перед использованием.</i>                  Эта процедура с ацетальдегидом предназначена для связывания SO<sub>2</sub> с ацетальдегидом, поэтому он будет защищен от окисления. Но результаты с набором Roche показывают, что связанный SO<sub>2</sub> больше не реагирует в течение 30 минут, а восстановление слишком низкое. Однако при колориметрическом анализе Enzytec Liquid E8600 этот связанный с ацетальдегидом SO<sub>2</sub> будет нормально реагировать.</p>
Лимонная кислота	<p>Был описан следующий метод:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– вес 1 г лимонной кислоты в 1 л</li> <li>– масса 590 мг Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (или 445 мг Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), что соответствует 300 мг/л</li> </ul>
ЭДТА	<p>Европейская норма EN 1988-2 гласит, что стандарт может быть изготовлен следующим образом:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– масса 0,600 г Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (= 0,300 г SO<sub>2</sub>)</li> <li>– добавить 37 мг ЭДТА</li> <li>– наполнить до 1 л и использовать стандарт в течение 30 минут</li> </ul> <p>В качестве альтернативы также можно использовать до 0,05 % ЭДТА (500 мг/л).</p> <p>ЭДТА является хелатирующим агентом, что означает, что он захватывает ионы металлов, таких как Ca<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup> и Mg<sup>+2</sup>, которые ингибируют фермент сульфитоксидазу в тесте Роша. Некоторые ионы металлов, такие как Cu<sup>+2</sup>, могут также катализировать окисление SO<sub>3</sub> до SO<sub>4</sub>, когда образец подвергается воздействию воздуха, что приводит к низким результатам. Добавление ЭДТА в качестве комплексообразователя ингибирует катализ Cu<sup>+2</sup>. Он также способствует окислению двухвалентного железа (железо+2) в трехвалентное железо (железо+3), тем самым снижая окислительно-восстановительный потенциал используемой воды.</p>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<p>В резолюции OENO № 0391-2010 OIV дает следующую рекомендацию:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– приготовить раствор путем смешивания 5 мл H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 % по объему) с 1 л дистиллированной воды</li> <li>– навесить 222,5 мг Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> и добавить 500 мл воды выше (= 300 мг/л SO<sub>2</sub>)</li> </ul>

### 2.11.5 Можно ли использовать Carrez для тестирования на сульфиты?

Реагенты Карреза разрушают SO<sub>2</sub>/SO<sub>3</sub>, присутствующие в образце. Таким образом, осветление Carrez не допускается ни с помощью Enzytec Liquid, ни с помощью набора Roche.

Если образец содержит большое количество белков, используйте кислотный метод депротенизации.

### 2.11.6 В чем разница между колориметрическими анализами?

#### а.) Принцип работы

Наши конкуренты работают по тому же принципу колориметрической реакции, но используют другой хромоген, чем Enzytec Liquid:

- для суммарного SO<sub>2</sub> конкуренты используют DTNB на 405 нм
- для без SO<sub>2</sub> конкуренты используют парарозанилин и формальдегид при длине волны 575 нм.
- мы используем другой хромоген, одинаковый для обоих тестов и работающий на длине волны 340 нм (не защищен патентом, поэтому мы не можем раскрывать название)

Таким образом, первое отличие от конкурентов заключается в том, что их измерение находится в видимом диапазоне, поэтому его искажает цвет образцов. Второе отличие заключается в том, что формальдегид очень токсичен. По этой причине мы выбрали другой хромоген, который работает при длине волны 340 нм, и мы добились лучших результатов для красных вин (поскольку нет помех от цвета).

## **b.) Применение и калибровка**

Третья причина несоответствий связана с приложением, включая калибровку:

- Эталонные методы – это ручные методы, которые выполняются одинаково во всем мире. Колориметрические методы обычно выполняются на автоматизированных системах с различным применением в зависимости от прибора и заказчика (объем образца и реагента, время инкубации и т. д.).
- Каждый колориметрический метод (конкуренты или E-Liquid) использует калибратор, поэтому это может привести к различиям, если калибраторы разные. Эталонные методы, такие как Roche (ферментативный = закон Ламберта-Бера), йодометрическое титрование или метод дистилляции, не зависят от какого-либо калибратора, это абсолютные методы.

### **2.11.7 Почему существуют различия между эталонными методами и колориметрическими методами?**

Вообще говоря, все колориметрические методы имеют трудности с красными винами, но наш тест дает меньше помех, потому что работает при 340 нм. Как объяснялось выше, несоответствующий образец необходимо измерять эталонным методом, а не другими колориметрическими методами, но даже здесь есть некоторые отличия:

- Существует 2 разных йодометрических метода, один с перегонкой, а другой без нее. Метод OIV не требует дистилляции, и большинство лабораторий используют его, потому что он самый простой. Однако результаты всегда выше, поскольку измеряются все редуцирующие вещества (аскорбиновая кислота и полифенолы). Правильным результатом является колориметрический, поскольку следует измерять только SO<sub>2</sub>, а не все редуцирующие вещества. Поскольку в красных винах редуцирующих веществ больше, чем в белых, наблюдаемые расхождения больше.
- Существует также другой эталонный метод из OIV, который включает дистилляцию в токе азота и титрование (метод называется «Франц Пауль» или «Монье-Вильямс» в зависимости от используемого оборудования). Это должен быть лучший референтный метод, но очень немногие лаборатории способны правильно его выполнять, и между лабораториями наблюдаются большие расхождения.

Расхождения, наблюдаемые при проведении сравнения методов, обусловлены следующими причинами.

- 1) Подготовка образца, как описано выше.
- 2) Различные принципы тестирования и приложения:
  - Ферментативный метод (Roche)
  - Колориметрический метод при 340 нм (Enzytec Liquid, RIDA CUBE) или с другими тестами (ДТНБ или параросанилин)
  - Ручной или автоматизированный, а во втором случае как калибруется
  - Йодометрическое титрование, включая или не включая редуценты
  - Перегонка с током азота или с током воздуха

Из-за важных различий между этими приложениями маловероятно, что при использовании этих разных методов будут получены идентичные результаты.

- 3) Третий уровень расхождений связан с используемыми калибраторами:
  - является ли это нативным образцом (вино, пиво, фруктовый сок) и как было измерено целевое значение
  - или это одно из описанных выше решений (свежий сульфит, соединение глутарового альдегида и т. д.)

Лучший способ исследовать разницу в калибровке — использовать один из образцов контроля качества, описанных в предыдущих вопросах выше.

- 4) Пожалуйста, не забудьте применить статистические правила, описанные выше, которые действительны для любого теста. Но поскольку SO<sub>2</sub> не является воспроизводимым тестом (стандартное отклонение высокое, в том числе и для эталонных методов), эти статистические правила особенно важны.

### 2.11.8 Заключение о противоречивых результатах

По всем причинам, изложенным выше, невозможно получить идеальную корреляцию между двумя методами. Но лучший подход — сравнить каждый образец с признанным эталонным методом:

- для свободного SO<sub>2</sub> мы использовали йодометрическое титрование, поскольку оно признано OIV эталонным для вин, а образцы в большинстве случаев представляют собой вина; Roche в любом случае не подходит, потому что это SO<sub>2</sub>-общий.
- для SO<sub>2</sub>-общего мы выбрали Roche, так как это SO<sub>2</sub>-общий; также можно было бы использовать йодометрическое титрование в качестве эталонного метода, если образцы вина

Наши результаты показывают, что наши тесты имеют хорошую корреляцию с эталонными методами. Также обязательным является измерение свежего контроля качества каждым из методов:

- Приготовить свежий маточный раствор метабисульфита натрия концентрацией 300 мг/л (навесить 1 г лимонной кислоты на 1 л, затем добавить 590 мг Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (или 445 мг Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), что соответствует 300 мг/л SO<sub>2</sub>).
- Сделайте свежее разведение в низком диапазоне, который вы хотите измерить (например, около 10 мг/л, если оно не содержит SO<sub>2</sub> в вине, или SO<sub>2</sub>-общее в пиве) и протестируйте его всеми анализами одновременно. Поскольку SO<sub>2</sub> быстро окисляется, все анализы необходимо проводить параллельно в течение одного и того же часа.

Если расхождения подтвердятся после проверки всех вопросов, описанных выше, мы можем собрать ваши образцы, а затем протестировать их четырьмя методами, которые у нас есть в Дармштадте (RIDA CUBE, Enzytec Liquid, Roche и йодометрическое титрование). Мы тестируем их в тот же день и после одинаковой пробоподготовки, поэтому мы избегаем многих проблем, описанных выше.

## 2.12 SO<sub>2</sub>-ОБЩИЙ (E8600)

### 2.12.1 В чем разница между анализами E-Liquid, Roche и RCS?

Когда слово «сульфит» упоминается без дополнительных уточнений, покупатели обычно имеют в виду общий сульфит. Для этой цели мы предлагали Roche 10725854035, E-Liquid E8600 или RCS4600. Комплекты RCS сделаны из соответствующего комплекта E-Liquid, поэтому RCS4600 изготовлен из Total Sulfit E8600.

В случае SO<sub>2</sub> принципы различаются между Roche и E-Liquid E8600 (или соответствующим RCS4600):

- Анализ Roche является ферментативным с сульфитоксидазой и НАДН-пероксидазой. Этот метод был признан Европейской, американской и японской фармакопеями, поэтому метод не может быть изменен в этих странах.
- Анализ жидкости Enzytec E8600 (или RCS4600) основан на колориметрии. Его можно использовать везде в пищевой промышленности, но не в фармацевтических компаниях, где действует Фармакопея.

### 2.12.2 Какой ПКО по сравнению с Roche?

Компания Roche прекратила производство своих анализов на сульфиты, и мы предлагаем в качестве замены набор Enzytec Liquid SO<sub>2</sub>-Totat (E8600). Это подняло вопрос о пределе количественного определения, который не рассчитывается и не выражается одинаково в обоих листках-вкладышах.

Тест Roche работает ферментативно, тогда как E-Liquid является колориметрическим анализом, но оба являются фотометрическими анализами, которые работают в соответствии с законом Ламберта-Бера:

$$c \text{ (г/л)} = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A$$

Оптимальный диапазон измерения составляет от  $\Delta A > 0,100$  (A) до  $\Delta A < 1,000$  (A). Для расчета предела количественного определения мы рекомендуем использовать  $\Delta A = 0,050$ , поскольку приведенные ниже результаты нелегко воспроизвести. Вообще говоря, объем  $V = 2,1$  мл для Enzytec Liquid и прил. 3 мл для Рош. Это означает, что концентрация  $c$  (г/л) для Enzytec Liquid меньше, чем для Roche, поэтому LoQ меньше для тех же  $\Delta A$  (0,050) и  $v$  (0,100 мл).

Для SO<sub>2</sub> у Enzytec Liquid есть дополнительное преимущество, поскольку эпсилон ( $\epsilon$ ) = 6,3 для набора Roche с НАДН, тогда как ( $\epsilon$ ) = 7.5 для Enzytec Liquid SO<sub>2</sub> (E8600), в котором используется другой хромоген. Из-за этого ПКО =  $c$  (г/л) еще меньше.

На самом деле, ПКО Roche и E-Liquid SO<sub>2</sub> можно рассчитать с помощью шаблонов Excel, доступных по запросу:

- Roche по строкам 21 и 22, ПКО = 3 мг/л для жидкой пробы с  $v = 0,5$  мл. ПКО может быть улучшен в 4 раза при использовании образца объемом 2 мл и дает 0,8 мг/л. Однако это следует выполнять только с высокоочищенными образцами.
- Для Enzytec Liquid доступен тот же файл, в котором ПКО = 2,5 мг/л (жидкость), также для образца 0,5 мл. ПКО, указанный в IFU, составляет 10 мг/л, поскольку он рассчитан для нормального объема образца 0,1 мл. Специальное приложение с образцом 2 мл также доступно по запросу и дает ПКО 0,7 мг/л.

### 2.12.3 Какова подготовка проб по сравнению с Roche?

Есть три уровня ответа на этот вопрос, от самого простого до более сложного.

- а.) Общее утверждение заключается в том, что если у клиента уже есть метод подготовки проб с набором Roche, ему не следует ничего изменять при переходе на Enzytec Liquid, Enzytec Generic или RIDA CUBE. Все эти методы являются фотометрическими (ферментативными или колориметрическими), поэтому вы можете переходить от одного к другому при одной и той же пробоподготовке. Что касается  $SO_2$ , подготовка проб с E-Liquid еще проще, потому что аскорбиновая кислота не мешает, поэтому вы можете не удалять аскорбиновую кислоту.
- б.) Если клиент начинает с набора E-Liquid (без опыта работы с Roche), он должен следовать общему методу с экстракцией водой, который описан в прилагаемых часто задаваемых вопросах. Так как это  $SO_2$ , экстрагировать не простой водой (даже если это свежая и качественная бидистиллированная вода), а использовать раствор лимонной кислоты 1 г/л. Поскольку метод является новым для клиента, он должен проверить его с помощью экспериментов с пиками.
- с.) Если водная экстракция не работает (извлечение проб с добавлением плохое), свяжитесь с нами, и мы обсудим более сложные методы проб, такие как Carrez или депротеинизация кислотами. Поскольку Carrez не разрешен для наборов  $SO_2$  (как и Roche), единственной возможностью будет депротеинизация кислотами.

### 2.12.4 Что можно использовать в качестве контроля качества?

Даже если выполняется калибровка, необходимо следить за ежедневными запусками посредством контроля качества. Для этого есть разные возможности:

- Возьмите образец вина с целевым значением, которое было определено с помощью эталонного метода (но содержание  $SO_2$  является летучим, поэтому храните аликвоты, измеряйте целевое значение одной аликвоты и используйте каждую аликвоту только один раз).
- Каждый день готовьте контроль качества из метабисульфита натрия ( $Na_2S_2O_5$ ). Мы рекомендуем разбавлять его водой, содержащей 1 г/л лимонной кислоты, чтобы улучшить стабильность этого контроля.
- Используйте «добавку глутарового альдегида бисульфита натрия» (см. ниже), преимущество которой состоит в том, что она очень стабильна, потому что она нелетучая и не окисляется кислородом, как  $SO_2$  или метабисульфит.

#### а.) Метабисульфит натрия ( $Na_2S_2O_5$ )

Мы используем следующий протокол:

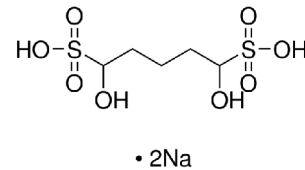
- Метабисульфит натрия от Sigma ( $Na_2S_2O_5$ ; кат. номер S9000-500g) с молекулярной массой 190,10 г/моль.
- поставить пластиковую пробирку 10 мл на высокоточные весы и сделать контрольную (вес = ноль)
- вес точно 44,5 мг метабисульфита натрия ( $Na_2S_2O_5$ ) непосредственно в пробирку, что эквивалентно 3 г/л  $SO_2$  (также можно использовать 59,0 мг  $Na_2SO_3$ , но он менее стабилен)
- добавить 10 мл охлажденной воды (объемом соли пренебрегаем) и растворить соль легким встряхиванием (не подмешивая в воду кислород)
- вместо воды рекомендуется использовать лимонную кислоту (1 г/л) или метафосфорную кислоту (1,5 %, pH 3,0 – 3,5), т. к. она обладает слабым защитным действием против окисления
- разбавьте точно до 1:10, чтобы получить 300 мг/л  $SO_2$ , или разбавьте до 10 мг/л (опять же с лимонной кислотой или метафосфорной кислотой)



## b.) Соединение присоединения гидросульфита натрия глутарового альдегида

Это соединение является стабильным и реагирует в анализе общего количества SO<sub>2</sub>:

- Доступно у Sigma (108790-50G)
- Линейная формула NaO<sub>3</sub>SCH(OH)(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH(OH)SO<sub>3</sub>Na
- Молекулярная масса: 308.24 г/моль
- Одна молекула будет реагировать с 2 x SO<sub>2</sub>, поэтому 154.12 г соединения эквивалентны 64.02 г SO<sub>2</sub>



Мы используем следующий протокол:

- Добавить гидросульфита натрия глутарового альдегида от Sigma (номер по каталогу 108790-50G)
- Поставить пластиковую пробирку 10 мл на высокоточные весы и сделать контрольную (вес = ноль)
- Взвесить точно 72,2 мг соединения непосредственно в пробирку и добавьте 10 мл воды (или отрегулируйте до точного веса)
- Целевое значение = (72,2 / 154,12) x 64,02 = 30 мг SO<sub>2</sub> / 10 мл = 3 г/л
- Разбавьте 1:10 (300 мг/л) и снова разбавьте для дальнейшего снижения концентрации до 10 мг/л

## c.) Контроль качества Sigma QC1541-20ML или PE1541-20ML

Ref.: QC 1541-20ML

Концентрация = 8 г/л (половина одной ампулы = 10 мл, разбавленная в 1 л = 80 мг/л). Это сертифицированный эталонный материал (CRM).

Этот контроль качества был стабилизирован с помощью ЭДТА. Он содержит 2 молекулы серы, из которых вступает в реакцию только одна, поэтому целевая концентрация составляет 4 г/л. Но это все равно очень много, поэтому нужно сильное разбавление.

## 2.12.5 Насколько сильны помехи от нитритов?

В инструкции по применению упоминается, что при использовании нитрита натрия наблюдались помехи. В этом эксперименте мы добавили в контрольные образцы SO<sub>2</sub> либо нитрит натрия (NaNO<sub>2</sub>), либо нитрат натрия (NaNO<sub>3</sub>) в концентрации 150 мг/л (выраженные как NO<sub>2</sub> и NO<sub>3</sub> соответственно).

Извлечение сульфита было близко к нулю для NO<sub>2</sub> (= сильное вмешательство) и к 95 % для NO<sub>3</sub>. (= отсутствие помех). В Германии максимальный предел в воде составляет 0,5 мг/л для NO<sub>2</sub> и 50 мг/л для NO<sub>3</sub>. Это означает, что пиковая концентрация 150 мг/л была плохим выбором для NO<sub>2</sub> (в 300 раз больше максимального предела) и хорошим выбором для NO<sub>3</sub> (в 3 раза больше максимального предела). У нас нет данных по восстановлению для более низких концентраций NO<sub>2</sub>, но при необходимости такие эксперименты можно было бы провести.

## 2.13 SO<sub>2</sub>-СВОБОДНЫЙ (E8610)

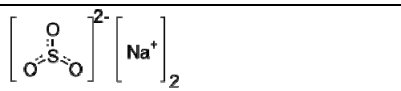
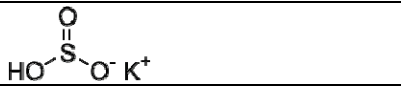

### 2.13.1 Что можно использовать в качестве контроля качества?

Поскольку калибровку нельзя проводить каждый день (см. выше), необходимо следить за ежедневными прогонами посредством контроля качества. Для этого есть разные возможности:

- Возьмите образец вина с целевым значением, которое было определено с помощью эталонного метода (но содержание SO<sub>2</sub> является летучим, поэтому храните аликвоты, измеряйте целевое значение одной аликвоты и используйте каждую аликвоту только один раз).
- Ежедневно готовьте контроль качества из метабисульфита натрия (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Мы рекомендуем разбавлять его водой, содержащей 1 г/л лимонной кислоты, чтобы улучшить стабильность этого контроля.
- Используйте тиосульфат (или любую из его солей), преимущество которого состоит в том, что он очень стабилен, потому что он не летуч и не окисляется кислородом после вскрытия.

### а.) Метабисульфит натрия

Любая сульфитная соль выделяет  $\text{SO}_3$  и поэтому подходит для контроля качества.

Сульфитные формы ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )	
Бисульфитные формы ( $\text{KHSO}_3$ )	
Метабисульфитные формы: $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (слева) или $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (справа)	

В зависимости от молекулярной массы необходимо перевести стандартную массу в концентрацию сульфита:

- $\text{Na}_2\text{SO}_3$  в  $\text{SO}_2$  = 50,8% (100 г/л сульфита натрия дают 50,8 г/л  $\text{SO}_2$  т.к. MW  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  =126,04 и содержит один анион  $\text{SO}_2$  с MW = 64,065)
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  в  $\text{SO}_2$  = 67,4% (MW 64,065 / MW 190.10, но содержит 2 молекулы серы)
- $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$  в  $\text{SO}_2$  = 57,6 % (MW 64,065 / MW 222.33, но содержит 2 молекулы серы)

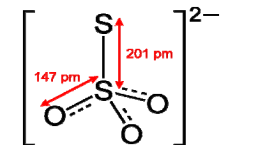
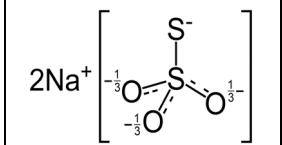
Вообще говоря, мы рекомендуем использовать метабисульфит калия ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , также называемый пиросульфитом калия) или метабисульфит натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), поскольку они более стабильны, чем соответствующие сульфитные формы ( $\text{K}_2\text{SO}_3$  или  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ).

Мы используем следующий протокол:

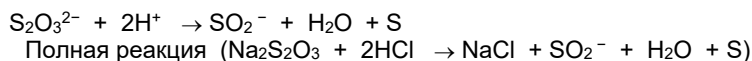
- Метабисульфит натрия от Sigma ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ; кат. №S9000-500g)
- поставить пластиковую пробирку 10 мл на высокоточные весы и сделать контрольную (вес = ноль)
- вес точно 44,5 мг метабисульфита натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) непосредственно в пробирку, что эквивалентно 3 г/л  $\text{SO}_2$  (также можно использовать 59,0 мг  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , но он менее стабилен)
- добавить 10 мл охлажденной воды (объемом соли пренебрегаем) и растворить соль легким встряхиванием (не подмешивая в воду кислород);
- вместо воды рекомендуется использовать лимонную кислоту (1 г/л) или метафосфорную кислоту (1,5 %, pH 3,0 – 3,5), т. к. она обладает слабым защитным действием против окисления
- разбавьте точно до 1:10, чтобы получить 300 мг/л  $\text{SO}_2$ , или разбавьте до 10 мг/л (опять же с лимонной кислотой или метафосфорной кислотой)

Даже в этих условиях мы рекомендуем держать контроль только в течение одного дня.

### б.) Тиосульфат

Тиосульфат представляет собой анион $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , с MW 112.13 г/моль		
Молекулярная масса тиосульфата натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) MW 158.11 г/моль	Тиосульфат	Тиосульфат натрия
Коммерческая форма обычно представляет собой пентагидрат ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) с MW 248.18 г/моль		

Анион тиосульфата имеет тетраэдрическую форму и получается из сульфата ( $\text{SO}_4$ ) путем замены одного из атомов кислорода атомом серы. Тиосульфаты устойчивы только в нейтральных или щелочных растворах, но не в кислых растворах из-за разложения на сульфит и серу:



Когда тиосульфат используется в тесте без  $\text{SO}_2$ , где pH очень кислый (около 1,5), одна молекула тиосульфата дает одну молекулу  $\text{SO}_2$  и реагирует в тесте (сера не будет реагировать). Таким образом, 1 моль/л тиосульфата будет реагировать как 1 моль/л  $\text{SO}_3$  или  $\text{SO}_2$ :

- при взвешивании тиосульфата (112,13 г/моль) целевое значение в единицах  $\text{SO}_2$  (64,06 г/моль) = (вес / 112,13) x 64,06
- при взвешивании тиосульфата натрия (158,11 г/моль) целевое значение в виде  $\text{SO}_2$  = (вес / 158,11) x 64,06
- при взвешивании пентагидрата тиосульфата натрия (248,18 г/моль) целевое значение  $\text{SO}_2$  = (вес / 248,18) x 64,06



Тиосульфат натрия также доступен в виде готового к использованию раствора, например:

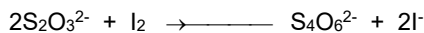
- Sigma Aldrich кат. №38243-1EA. Этот концентрированный раствор разбавляют 1 л воды, получая концентрацию  $0.01 \text{ M} = 1.58 \text{ г/л Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 0.01 \text{ M SO}_2$  ( $64 \text{ г/моль} = 0.64 \text{ г/л}$  в анализе  $\text{SO}_2$ -свободного.
- VWR (1.09909.0001) или Merck-Millipore (109909). Концентрированная ампула тиосульфата натрия (титрисол) на 1 л стандартного раствора. После разведения 1 ампулы в 1 л концентрация =  $0,01 \text{ M Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ( $0,01 \text{ N}$ ) =  $0,01 \text{ M SO}_2$  ( $64 \text{ г/моль}$ ) =  $0,64 \text{ г/л}$  в анализе  $\text{SO}_2$ -свободного.
- VWR (1.09950)
- HACH кат. №24084-49 (VWR = HACH2408449). Сульфитный эквивалентный стандартный раствор ( $80,06 \text{ г/моль}$ ) при йодометрическом титровании. Это эквивалентно  $12 \text{ мг/л SO}_2$  ( $64,06 \text{ г/моль}$ ) =  $24 \text{ мг/л}$  в анализе без  $\text{SO}_2$ , поскольку результаты в 2 раза выше, как поясняется ниже.

Когда тиосульфат тестируется йодометрическим титрованием, он дает половину извлечения из анализа  $\text{SO}_2$ -свободного (E8610):

Свободный сульфит ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) окисляется до сульфата ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), а йод ( $\text{I}_2$ ) восстанавливается до йодида ( $\text{I}^-$ ):



Когда тиосульфат ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) измеряется в йодометрическом анализе, он дает тетраионат ( $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ) и йодид, и две молекулы тиосульфата необходимы для реакции с одним йодом:

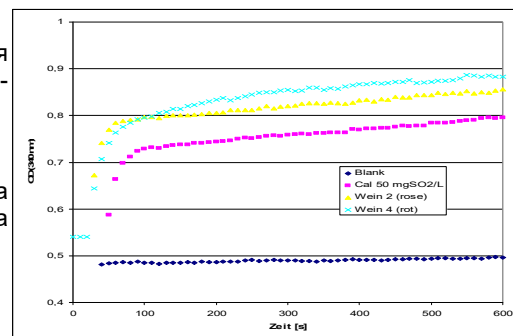


Поскольку на один моль/л йода требуется два моля/л тиосульфата, концентрация будет составлять половину значения, полученного с помощью анализа Enzytec Liquid без  $\text{SO}_2$  (где соотношение составляет 1 к 1).

### 2.13.2 Можно ли инкубировать более 5 минут?

Этот тест является колориметрической реакцией без участия фермента, поэтому он очень быстрый, и достаточно 5-минутной инкубации.

После этих 5 минут в стандарте, а также в образцах вина наблюдается легкая реакция ползучести, как показано на рисунке справа.



Скорость реакции ползучести не совсем одинакова для эталона (кал 50 мг/л) и образцов (Вейн 2 и Вейн 4), а для холостого образца значительно слабее. Поэтому необходимо соблюдать время инкубации 5 мин, установленное для этого теста. Если время инкубации будет увеличено, результаты проб будут выше ожидаемых.

### 2.13.3 Насколько стабилен свободный $\text{SO}_2$ в образцах вина?

Как только образец вина открыт, свободный  $\text{SO}_2$  должен быть проверен как можно скорее и, если возможно, немедленно, потому что он нестабилен. Мы провели исследование с 3 винами, хранящимися в аликвотах.

- мы использовали пробирки 50 мл (Falcon или Greiner), наполнили их доверху, чтобы не было воздуха, плотно закрыли их и дополнительно использовали парафильм для предотвращения попадания воздуха/кислорода в пробирку.
- пробирки хранились в холодильнике и тестировались сразу после вскрытия со следующими результатами:

	Концентрация (мг/л)		
	День 0	День 1	День 7
Белое вино	24,4	22,3	16,2
Розовое вино	37,3	34,4	28,7
Красное вино	45,7	39,3	27,6

Эти результаты подтверждают, что свободный- $\text{SO}_2$  теряется даже в закрытых пробирках и при отсутствии контакта с  $\text{O}_2$ .

### 2.13.4 Как следует обращаться с пробями, чтобы избежать потерь SO<sub>2</sub>?

Как указано выше, свободный SO<sub>2</sub> частично теряется при хранении даже в закрытых пробирках. Следовательно, образцы следует тестировать как можно скорее, а если проводится корреляционное исследование, то разные тесты необходимо проводить на одном и том же образце в один и тот же день.

Сначала следует перемешать винную бутылку (или флакон), затем аликвоту переносят в лабораторную пробирку для исследования. Пожалуйста, возьмите тубик на 10 мл или 50 мл и наполните его как можно меньшим количеством воздуха, оставшегося сверху (поскольку O<sub>2</sub> вызывает окисление), и плотно закройте тубик. Затем подготовьте тестовый прогон со всеми реагентами, кюветами и т. д., пока не начнется пипетирование образцов. Когда образцы следует перебирать пипеткой, помните, что SO<sub>2</sub> является летучим, поэтому он скапливается под поверхностью вина и в небольшой воздушной части, которая остается наверху пробирки. Поэтому осторожно перемешайте пробирку, чтобы повторно растворить SO<sub>2</sub> во всем доступном объеме пробы. Затем откройте пробирку, пипеткой внесите необходимый объем в тест-кювету и сразу же снова закройте пробирку с образцом.

Если образцы должны быть протестированы с помощью сравнительного метода, такого как йодометрическое титрование, проверьте их сразу после завершения первого теста или позвольте второму оператору проверить его параллельно.

### 2.13.5 Почему Калибратор только на 50 мг/л?

Образцы вина могут содержать до 300 мг/л общего содержания SO<sub>2</sub>, поэтому калибратор был установлен на 150 мг/л в анализе Enzytec Liquid SO<sub>2</sub>-Total (E8600), а линейность была проверена до 300 мг/л. Но концентрация свободного SO<sub>2</sub> обычно ниже 50 мг/л и никогда не превышает 100 мг/л. Следовательно, концентрация калибратора составляет 50 мг/л в анализе без SO<sub>2</sub> (E8610).

Однако линейность теста доходит до 300 мг/л. Если необходимо протестировать образцы с концентрацией выше 50 мг/л, можно построить линейную калибровочную кривую от 0 до 300 мг/л, аналогично анализу SO<sub>2</sub>-Общий.

### 2.13.6 Как долго калибратор стабилен после открытия?

Когда тест используется на биохимических анализаторах, стандарт обычно помещают в маленькие чашки для образцов, как показано здесь (иногда называемые педиатрическими чашками):



В таких флаконах мы видели потери SO<sub>2</sub> до 25%, 50% и 75% соответственно. 2, 4 и 6 часов. Поэтому мы рекомендуем выполнить калибровку только один раз, а затем выбросить флакон. Поскольку флаконы калибратора содержат по 3,5 мл каждый, можно будет выполнить множество калибровок.

На самом деле реагенты R1 и R2 более стабильны, чем калибратор. Поэтому мы рекомендуем выполнять калибровку только один раз при открытии нового комплекта и сохранять ту же кривую до тех пор, пока комплект не будет готов. Следующие прогоны выполняются с контролем качества, и калибровка повторяется только в том случае, если контроль выходит за свои пределы.

### 2.13.7 Какова корреляция для красных вин?

Мы протестировали корреляцию для проверки наборов, и результаты отображаются в буклете с информацией о продукте (ручной метод и автоматизированные системы).

Мы повторяем ручные измерения для каждой новой партии продукции, сравнивая их с йодиметрическим титрованием, а также следим за стабильностью партий каждые 3 месяца. У нас есть хорошая корреляция для белых и красных вин, но при нескольких условиях:

- покупаем 12 бутылок одного вина и храним их при комнатной температуре в темноте
- берем для каждого теста новую бутылку; для SO<sub>2</sub>-общий мы не видим разницы от одной бутылки к другой (через 3 месяца), но для SO<sub>2</sub>-свободный мы видим медленное снижение с каждой новой бутылкой (даже если она никогда не открывалась).

- когда мы начинаем тестирование, бутылка перемешивается и открывается, и мы переносим аликвоту в пробирку на 50 мл для облегчения работы (мы предпочитаем 50 мл вместо 10 мл, потому что количество более репрезентативно для образца)
- 50-миллилитровая пробирка заполнена доверху и плотно закрыта (см. более подробную информацию и обращение с пробами в разделе 1.4.2).
- Контрольным тестом является йодометрическое титрование, которое проводится не более чем за 3 часа.
- для йодометрического титрования используем метод с перегонкой во избежание образования редуктонов; для руководства Enzyte Liquid, пожалуйста, сделайте интенсивный отлив шпателем, как описано в IFU.

Вообще говоря, биохимические анализаторы не могут работать без SO<sub>2</sub>, потому что:

- Чашки для образцов маленькие и остаются открытыми, поэтому SO<sub>2</sub> быстро теряется
- Температура 37°C может быть проблемой, так как она ускоряет испарение; по возможности рекомендуем работать при 25°C

## 2.14 МОЧЕВИНА / АММИАК (E8395)

### 2.14.1 Как выполняется расчет?

Во время теста мочевины гидролизуются на 2 молекулы аммиака, которые измеряются. Свободный аммиак следует измерять отдельно (E8290) и вычитать из результата для мочевины/аммиака. Но есть разница между молекулярной массой мочевины (60,06 г/моль) и двумя молекулами аммиака (2x 17,03 = 34,06 г/моль), поэтому для расчетов необходимо использовать поправочный коэффициент 1,763 (60,06/34,06).

Кроме того, это зависит от того, как откалиброван тест мочевины (см. тот же принцип для анализа сахара/глюкозы).

#### а.) Ручной анализ с MW мочевины

Для ручного анализа мы используем молекулярную массу мочевины для расчета по Ламберу-Биру. Если в образце отсутствует свободный аммиак, анализ даст правильную концентрацию мочевины без каких-либо расчетов.

Если в образце присутствует свободный аммиак, его значение будет завышено с молекулярной массой в 1,763 раза. Следовательно, свободный аммиак необходимо измерять отдельно, а также умножать на коэффициент 1,763 перед вычитанием (см. IFU):

$$\text{Мочевина (г/л)} = \text{Мочевина/Аммиак E8395 (г/л в виде аммиака)} - [1,763 \times \text{Аммиак E8390 (г/л аммиака)}]$$

#### б.) Автоматический анализ с молекулярной массой аммиака

Для автоматизированных систем проще калибровать оба анализа с помощью одних и тех же калибраторов аммиака. В этом случае тест мочевины/аммиака E8395 занижает концентрацию мочевины в 1,763 раза, но свободный аммиак измеряется правильно. По этой причине концентрацию мочевины необходимо пересчитать следующим образом:

$$\text{Мочевина (г/л)} = 1,763 \times [\text{Мочевина/Аммиак E8395 (г/л в виде мочевины)} - \text{Аммиак E8390 (г/л аммиака)}]$$

## 3 ПРИМЕНЕНИЕ НА АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ СИСТЕМАХ (ТОЛЬКО ВОПРОСЫ, ОТНОСЯЩИЕСЯ К ENZYTEC LIQUID)

### 3.1 ОБЩИЕ ВОПРОСЫ (ЖИДКОСТЬ ДЛЯ АВТОМАТИЗАЦИИ)

#### 3.1.1 Почему жидкие реагенты идеально подходят для автоматизации биохимических анализаторов?

Жидкие реагенты Enzytec особенно хорошо подходят для использования в автоматизированных системах по следующим причинам:

- Все реагенты готовы к использованию; нет восстановления реагентов и нет рабочего раствора для подготовки к автоматизированной системе. Все лаборатории будут использовать одни и те же реагенты, что позволит избежать ошибок, технических проблем и расхождений между лабораториями и результатами.
- Реагенты готовы, поэтому их можно декантировать в специальные флаконы вашего анализатора. Если реагенты в системе охлаждаются, они могут даже оставаться на борту в течение недель и месяцев. В противном случае оператор должен каждый вечер класть их обратно в холодильник, но в любом случае вы избежите потери мертвого объема на дне флаконов (1-2 мл каждый день, так что вы сэкономите много денег по сравнению с Дженирик Enzytec, мертвый объем которого нестабилен и должен быть выброшен).
- Поскольку реагенты стабильны на борту, частота калибровки может составлять всего один раз в 30 дней, в зависимости от набора тестов и используемого метода. Это обеспечивает дополнительную экономию средств, особенно когда каждый день проводится несколько тестов.
- Для всех наборов Enzytec Liquid ручная процедура одинакова: 100 образцов + 2000 R1 л R1, 500 R2 л R2 и 500 мкл R3. Пропорция 4 + 1 + 1 должна соблюдаться при изменении громкости. Для большинства анализаторов мы разработали приложения с 160 R1| R1, 40 R2| R2 и 40 R3| R3. Для конкретных приложений будет очень легко протестировать различные возможности, просто соблюдая соотношение 4 + 1 + 1.
- С нашими приложениями 160 + л + 40 мкл + 40 мкл можно будет провести 500 тестов на набор вместо 40 тестов при ручном применении. Классические тесты (от Roche или от Scil) позволяют проводить в среднем 300 тестов на набор на автоматизированных системах. Таким образом, даже если комплекты Liquid стоят дороже, цена/тест может быть ниже, чем с дженериковой линейкой (особенно если учесть, что вы больше не теряете мертвый объем).

В отдельной брошюре под названием «Буклет Enzytec Liquid\_Application для автоматизации» содержится подробная информация о том, как настроить приложения на любом биохимическом анализаторе. Пожалуйста, обратитесь к местному представителю R-Biopharm за этой брошюрой.

#### 3.1.2 Что происходит с принципом 4 + 1 + 1, когда в приборе имеется менее 3 реагентов?

Общее правило для всех тестов Enzytec Liquid: 4 + 1 + 1, поскольку реагенты присутствуют в наборе именно в таком соотношении (80 мл B1 + 20 мл B2 + 20 мл B3). Для ручного применения объем составляет 2 мл + 500 мкл + 500 мкл. Для всех автоматизированных приложений это правило было переведено в 160 мкл B1 + 40 мкл B2 + 40 мкл B3.

Это правило применяется всегда, даже если используется менее 3 реагентов.

- Когда в наборе присутствуют только B1 и B2, B3 просто исчезает, поэтому правило 4 + 1 = 160 мкл + 40 мкл.
- Когда в наборе присутствуют B1, B2 и B3, некоторые инструменты не могут их обрабатывать, поэтому их необходимо предварительно смешать, чтобы закончить с 2 реагентами:
  - либо путем смешивания B1 + B2, тогда соотношение будет  $5(B1 + B2) + 1B3 = 200 \text{ мкл } (B1 + B2) + 40 \text{ мкл } B3$
  - или смешав B2 + B3, тогда соотношение будет  $4B1 + 2(B2 + B3) = 160 \text{ мкл } B1 + 80 \text{ мкл } (B2 + B3)$

Таким образом, всегда применяется правило 160 мкл + 40 мкл + 40 мкл.

#### 3.1.3 Как можно закончить один реагент раньше других?

Все применения основаны на одинаковых объемах реагентов: 160 мкл из флакона B1, 40 мкл из флакона B2 и 40 мкл из флакона B3. Таким образом, теоретическое количество анализов всегда составляет 500 тестов/набор:

- B1 = 4 x 20 мл = 80 мл, разделить на 160 мкл = 500 тестов
- B2 / B3 = 4 x 5 мл = 20 мл, разделить на 40 мкл = 500 тестов

Возьмем в качестве примера глюкозу/фруктозу. Есть 3 бутылки, и любые инструменты могут обрабатывать только 2 реагента, поэтому необходимо предварительно смешать  $R1 = B1 + B3$  и  $R2 = B2$ . Вышеупомянутые объемы соблюдаются, поэтому теоретически должно быть возможно выполнить 500 тестов / комплект.

Но на практике возникает дополнительный вопрос о мертвых объемах, которые возникают по 2 причинам

а.) Когда инструменты пипетируют  $R1$  и  $R2$ , они всегда пипетируют немного больше, чем нужно, а остальное отбрасывают. Это зависит от настроек прибора, но общее правило заключается в том, что это количество является фиксированным (например, 100 мкл). Это означает, что вы теряете больший процент от реагента малого объема  $R2$ , чем от реагента большого объема  $R1$ . Следовательно, будет разница в потреблении реагентов между  $R1$  и  $R2$ . Таким образом, в нашем примере бутылка  $R2 = B2$  будет использоваться перед бутылками  $R1 = B1 + B3$ .

Чтобы избежать этого, есть две возможности:

- изменить настройки прибора, чтобы иметь одинаковый % потерь для обоих реагентов (но это сложно и должен делать сервисный инженер)
- Либо добавлять воду при приготовлении  $R2$ , пока разницы в расходе реагента уже не будет. Пожалуйста, попробуйте, добавив по 0,5 мл в каждый флакон  $B2$  (это +10%), проверьте ситуацию на некоторое время и исправьте, если необходимо

б.) Когда прибор пипетирует реагент, игла не может опуститься, чтобы пипетировать 100% реагента на дне флакона.

Таким образом, на конце каждого флакона есть второй мертвый объем. Чтобы это исправить, у нас в  $B1$  иногда больше 20 мл (20,8 мл), а в  $B2/B3$  больше 5 мл (5,5 мл). Но это не так для Глюкозы/фруктозы (у нас ровно 20,0 мл в  $B1$  и 5,0 мл в  $B2/B3$ ), поэтому может быть разница в расходе реагента и  $B2$  закончится раньше  $B1+B3$ .

Поскольку реагенты стабильны, мы рекомендуем не выбрасывать мертвый объем флаконов, а наполнить флаконы свежим реагентом. В конце каждого дня помещайте флаконы с реагентами обратно в холодильник и наполняйте их на следующий день. Мы рекомендуем выбрасывать мертвый объем только один раз в месяц и начинать заново со свежими и новыми флаконами.