

УФ-анализ для определения нативного крахмала в пищевых продуктах и других образцах
Комбинация тестов на 50 определений

Только для использования *in vitro*
Хранить при 2 - 8 °C

1. Принцип работы

Фермент амилоглюкоамилаза (AGS) расщепляет крахмал до D-глюкозы:

Крахмал + (n-1) H₂O — AGS → n D-глюкоза

Образовавшаяся D-глюкоза фосфорилируется АТФ в присутствии фермента гексокиназы (ГК) до D-глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф), одновременно продуцируя АДФ:

D-глюкоза + АТФ — ГК → D-глюкозо-6-фосфат + АДФ

В присутствии глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (G6P-DH) D-глюкозо-6-фосфат окисляется до D-глюконат-6-фосфата:

G-6-P + НАД⁺ — G6P-DH → D-глюконат-6-фосфат + НАДН + Н⁺

Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) восстанавливается до НАДН. Количество образовавшегося НАДН пропорционально количеству образовавшейся D-глюкозы и измеряется при 340 нм.

2. Реагенты

2.1. Состав набора

Тест подходит для ручного и автоматизированного анализа. При ручном анализе реактивов хватает на 50 определений. Количество определений для автоматизированного анализа больше в несколько раз; однако это зависит от устройства.

- Реагент 1: 2 x 50 мл с буфером, AGS, ATP, NAD
- Реагент 2: 2 x 12.5 мл с буфером, НК, G6P-DH

2.2. Подготовка реагентов

Реагенты готовы к использованию и должны быть доведены до комнатной температуры (20-25 °C) перед использованием. Не заменяйте компоненты между наборами из разных партий.

2.3. Хранение и стабильность

Реагенты стабильны до конца месяца указанного срока годности (см. этикетку) даже после вскрытия, если хранить их при 2-8 °C и правильно использовать. Не замораживайте реагенты.

2.4. Безопасность и утилизация

При работе с набором должны соблюдаться общие правила безопасности химической лаборатории. Не глотать! Избегайте контакта реагентов с кожей и слизистыми оболочками.

Этот комплект может содержать опасные вещества. Примечания об опасности содержащихся веществ см. в соответствующих паспортах безопасности (SDS) для данного продукта. После использования реагенты могут быть утилизированы вместе с лабораторными отходами. Упаковочные материалы могут быть переработаны.

3. Пробоподготовка

- Подготовка проб для ручного и автоматизированного тестирования одинаковая.
- Важно! Образец должен обрабатываться последовательно. Это означает, что экстракцию ни в коем случае нельзя останавливать.
- Взвесьте 50–500 мг гомогенизированного образца (максимальное общее содержание крахмала 50 мг) в колбу Эрленмейера на 50 мл.
- Добавьте 5 мл 32 % HCl и перемешивайте в течение 2–3 мин. Затем добавьте 15 мл ДМСО, закройте колбу Эрленмейера парапленкой и перемешивайте при 60°C не менее 60 мин.
- Быстро охладите смесь до 20 - 25°C, перенесите в мерную колбу вместимостью 50 мл и добавьте 5 мл 8 М NaOH
- Промойте 0,1 М цитратным буфером, pH 4,0, доведите объем до 50 мл.
- Инкубируйте раствор пробы в течение 15 мин при 50 - 55°C перед анализом.

4. Анализ

Длина волны: 340 нм
Температура: 20 - 37 °C (во время измерений)
Измерения: против воздуха (без кюветы) или воды
Диапазон измерений: 10 - 1000 мг/л

Важно: Инкубируйте образец 15 минут при 50–55 °C перед определением.		
	Холостой образец	Образец / контроли
Реагент 1	2000 мкл	2000 мкл
Образец / контроль	-	100 мкл
Дист. вода	100 мкл	-
Перемешать, инкубировать 10 мин при 20-37°C. Измерить абсорбцию A1, затем добавить:		
Реагент 2	500 мкл	500 мкл
Перемешать, инкубировать в течение 10 мин при 20–37 °C и измерьте абсорбцию A2.		

Холостое значение реагента должно быть определено один раз для каждого запуска и вычтено из результата каждого образца.

5. Вычисление результатов

5.1. Вычисление для растворов

5.1.1. Общая концентрация крахмала

$$\Delta A = (A_2 - df \times A_1)_{\text{образец}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{RB}}$$

df: Фактор разведения

RB: Холостой образец

$$df = \frac{\text{объем образца} + R1}{\text{анализир. объем}} = 0.808$$

Увеличение объема пробы (максимум до 1000 мкл) при неизменном объеме реагента требует пересчета коэффициента разбавления реагента (df).

$$C_{\text{общий крахмал}} [\text{г/л}] = \frac{(V \times MW \times \Delta A)}{(\epsilon \times d \times v \times 1000)} = 0.669 \times \Delta A$$

V:	Анализируемый объем [мл]	= 2.600
MW:	Молекулярная масса [г/моль]	= 162.14
d:	Оптический путь [см]	= 1.00
v:	Объем образца [мл]	= 0.100
ε:	Коэффициент экстинкции NADH [л/ммоль x см]	= 6.3 (при 340 нм)

5.1.2. Расчет реальной концентрации крахмала

Полученный результат теста E8100 может включать концентрацию мальтозы, D-глюкозы, их олигомеров и производных, а также сахарозы, которые могут присутствовать в образце.

Такой результат рассчитывается с использованием молекулярной массы мономеров крахмала (162,14 г/моль) и называется общим крахмалом. Для определения реальной концентрации крахмала необходимо определить сумму сахаров (мальтозы, D-глюкозы, их олигомеров и производных, а также сахарозы) с помощью анализа Enzytec™ Liquid Maltose/Sucrose/D-глюкоза (E8170). Результат выражается как общая мальтоза (342,3 г/моль) и вычитается из общего количества крахмала для дифференциации:

$$C_{\text{крахмал}} [\text{г/л}] = C_{\text{общий крахмал E8100}} - 0.95 \times C_{\text{общая мальтоза E8170}}$$

Убедитесь, что для определения концентрации общего крахмала и общей мальтозы используются одни и те же коэффициенты разбавления. При необходимости их следует отрегулировать в соответствии с индивидуальными экстракциями.

5.2. Вычисления для твердых образцов

$$\text{Содержание}_{\text{крахмала}} [\text{г}/100 \text{ г}] = \frac{C_{\text{крахмал}} [\text{г}/\text{л раствора образца}]}{\text{масса}_{\text{образца}} \text{ в г/л р-ра образца}} \times 100$$

5.3. Контроль и критерии приемлемости

Контрольные или эталонные образцы следует проводить параллельно анализируемым образцам для контроля качества во время каждого анализа. Для этой цели мы рекомендуем имеющийся в продаже крахмал с известной чистотой и содержанием воды.

Извлечение чистых контрольных растворов крахмала должно быть в пределах $100 \pm 5 \%$, а для экстрагированных образцов крахмала — в пределах $100 \pm 10 \%$.

6. Технические характеристики

6.1. Специфичность

Амилглюкозидаза гидролизует α -1,4- и α -1,6-гликозидные связи. Они встречаются в крахмале (амилозе и амилопектине), а также в полисахаридах, таких как декстрин, гликоген и олигосахариды глюкозила. Мальтоза, мальтодекстрин и глюкоза проявляют побочную активность более 90 % (сахароза реагировала при 52 %). Включенная гексокиназа специфична для D-глюкозы.

Растворы образцов, содержащие сахарозу, мальтозу, свободную D-глюкозу и другие олигосахариды, необходимо тестировать отдельно с помощью Enzytec™ Liquid Maltose/Sucrose/D-Glucose (E8170). Полученное общее содержание мальтозы необходимо вычесть из общего результата, как описано в разделе «Вычисление результатов».

6.2. Интерференция

Диоксид серы и аскорбиновая кислота мешают при концентрации $> 2 \text{ г/л}$, а лимонная кислота — при концентрации $> 50 \text{ г/л}$.

6.3. Линейность, диапазон измерений & чувствительность

Линейность дается до 1000 мг/л общего крахмала с рекомендуемым диапазоном измерения от 10 до 1000 мг/л. Предел обнаружения (LoD) определяли для объема образца $v = 100 \text{ мкл}$ по методу DIN 32645:2008-11 в забуференном водном растворе. В результате LoD составляет 3,0 мг/л. Предел количественного определения (LoQ) был определен по профилю прецизионности и составляет 10,0 мг/л. Наименьшая разница в абсорбции, которую может определить этот метод, составляет $\Delta A = 0,005$. Для объема образца $v = 1000 \text{ мкл}$ это дает LoD 0,09 мг/л. На основании $\Delta A = 0,010$ был рассчитан LoQ, равный 0,18 мг/л.

7. Сопровождающая документация

По запросу доступны следующие документы:

- Enzytec™ Liquid Валидационные отчеты
- Enzytec™ Liquid Руководство по пробоподготовке
- Enzytec™ Liquid Шаблоны Excel для расчета результатов
- Enzytec™ Liquid Руководство по устранению неполадок

8. Техническая поддержка

На территории России:

ООО "Неотест", +7 499 704 05 50, support@neo-test.ru

На территории Беларуси:

ОДО "КомПродСервис", +375 17 336 50 54, support@komprod.com

9. Дисклеймер

Эта информация соответствует нашему нынешнему уровню технологий и предоставляет информацию о наших продуктах и их использовании. R-Biopharm не дает никаких гарантий, явных или подразумеваемых, за исключением того, что материалы, из которых изготовлены ее продукты, имеют стандартное качество. Дефектные продукты будут заменены. Нет никаких гарантий товарной пригодности этого продукта или пригодности продукта для каких-либо целей. R-Biopharm не несет ответственности за любой ущерб, в том числе фактический или косвенный ущерб, или расходы, возникающие прямо или косвенно в результате использования этого продукта.

Официальный дистрибьютор
в России:
ООО "НеоТест"
ул. Раstopчина, 1Г, г. Владимир
+7 499 649 02 01
info@neo-test.ru
www.neo-test.ru



Официальный дистрибьютор
в Беларуси:
ОДО "КомПродСервис"
ул. Филимонова, 25Г, г. Минск
+375 17 336 50 54
info@komprod.com
www.komprod.com

