

Photometrie Kompendium

In Kooperation mit

GIT LABOR-
FACHZEITSCHRIFT

Photometrische Bestimmung von D-Glucose

Spezial/Multiwellenlängen-
Methode mit
WTW photoLab[®] UV-VIS
Spektralphotometern

Photometrische Bestimmung von D-Glucose

Photometer	WTW Spektralphotometer PhotoLab 6600 UV/VIS oder PhotoLab 7600 UV/VIS
Test	Enzymatischer UV-Test D-Glucose (10 716 251 035) der Firma BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM
Methode	Spezial / Multi-Wellenlänge
Messung	Probe und Leerwert bei 340 nm

Inhalt dieser Dokumentation

- Teil 1: Allgemeine Beschreibung
- Teil 2: Analysenvorschrift
- Teil 3: Methodenparameter; Formeldesign
- Teil 4: Programmierung der Methode

Teil 1	Allgemeine Beschreibung
--------	-------------------------

Bei der enzymatischen Umsetzung von D-Glucose zu D-Gluconat-6-Phosphat wird eine äquivalente Menge des Oxidationsmittels Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid / Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NAD⁺/NADP⁺) zu NADH/NADPH reduziert. NADH/NADPH besitzt bei 340 nm eine spezifische Absorption und kann photometrisch bestimmt werden.

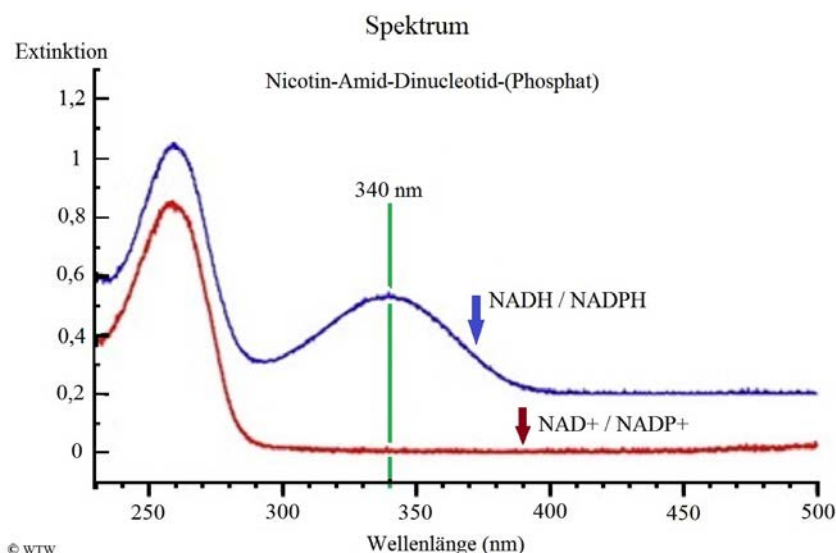
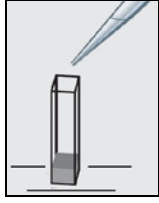
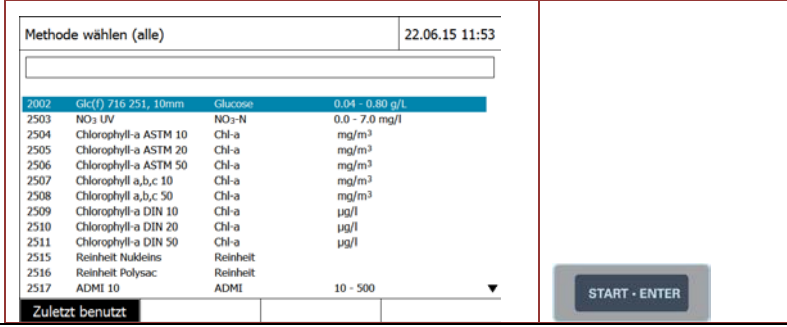
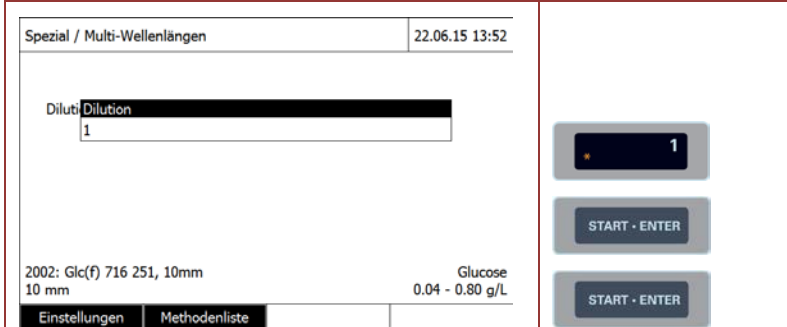
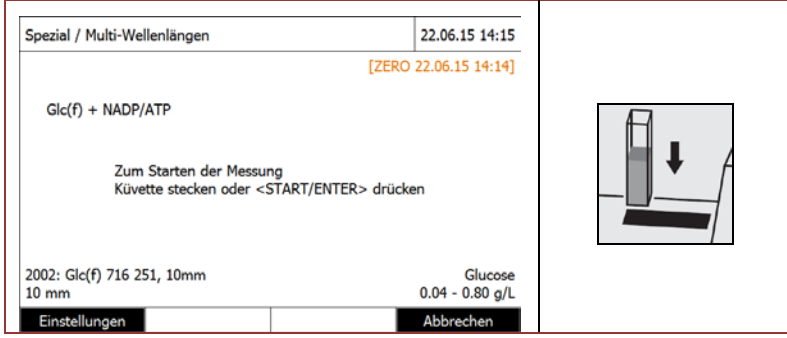
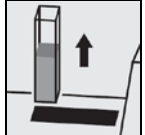


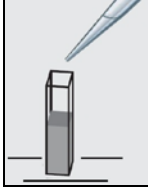
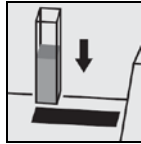
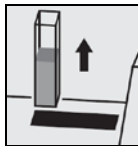
Abbildung 1: Extinctionsspektrum NAD⁺/NADP⁺ und NADH/NADPH.

Teil 2	Analysenvorschrift
--------	--------------------

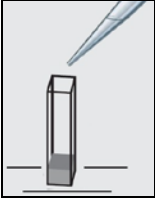
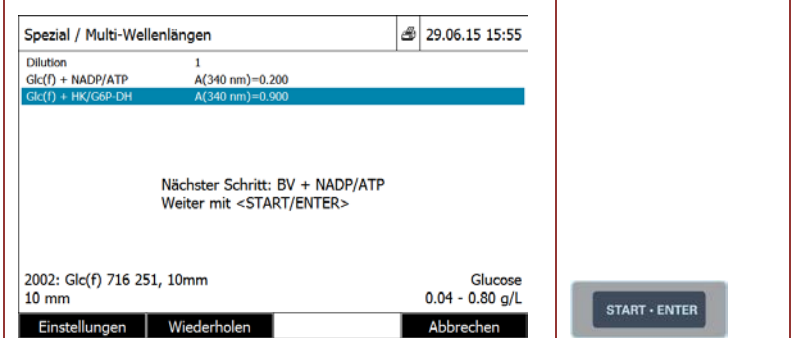

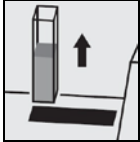
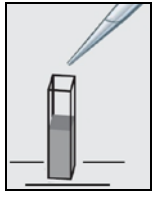
Durchführung der Bestimmung


Glucose aus Disacchariden wird nur nach vorherigem Aufschluss erfasst.


Probe	Photometer										
<p>In eine leere 10 mm Rechteckküvette werden gegeben:</p> 	<p style="text-align: center;">Auswahl Multi-Wellenlängen Methode: Glc(f) 716 251, 10 mm</p> 										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%;">1,000 ml</td> <td>Reagenz 1, NADP und ATP</td> </tr> <tr> <td>+ 0,100 ml</td> <td>Probe</td> </tr> <tr> <td>+1,900 ml</td> <td>bidest. Wasser</td> </tr> <tr> <td>mischen</td> <td></td> </tr> <tr> <td>3 min.</td> <td>Reaktionszeit</td> </tr> </table>	1,000 ml	Reagenz 1, NADP und ATP	+ 0,100 ml	Probe	+1,900 ml	bidest. Wasser	mischen		3 min.	Reaktionszeit	<p style="text-align: center;">Dilution</p> <p>Verdünnungsfaktor einstellen. Der Verdünnungsfaktor multipliziert das Ergebnis mit dem hier eingestellten Zahlenwert.</p> 
1,000 ml	Reagenz 1, NADP und ATP										
+ 0,100 ml	Probe										
+1,900 ml	bidest. Wasser										
mischen											
3 min.	Reaktionszeit										
<p>1. Extinktionsmessung</p> <p style="text-align: center;">Glc(f) + NADP/ATP</p> <p>Messung der D-Glucose nach Zugabe von Reagenz 1, Probe und bidestilliertem Wasser</p>	<p style="text-align: center;">Küvette in den Küvetenschacht stellen; die Messung wird automatisch gestartet.</p>  <p style="text-align: center;">Nach der Messung die Küvette mit der Analysenlösung zur Weiterbearbeitung aus dem Küvetenschacht nehmen.</p> 										

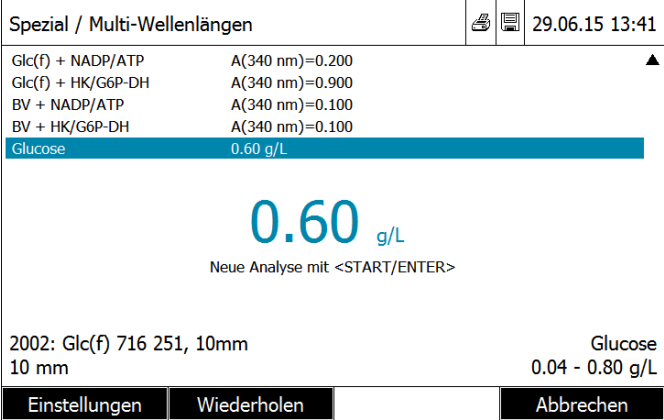
<p>In dieselbe Küvette werden gegeben:</p> <div style="text-align: center;">  </div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <tr> <td style="width: 15%; padding: 2px;">+ 0,020 ml</td> <td style="padding: 2px;">Reagenz 2, G6P-DH und HK</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">mischen</td> <td style="padding: 2px;"></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">10 - 15 min.</td> <td style="padding: 2px;">Reaktionszeit</td> </tr> </table>	+ 0,020 ml	Reagenz 2, G6P-DH und HK	mischen		10 - 15 min.	Reaktionszeit	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="font-size: small;">Spezial / Multi-Wellenlängen</td> <td style="text-align: right; font-size: small;">29.06.15 15:33</td> <td style="text-align: center;">START - ENTER</td> </tr> <tr> <td style="font-size: x-small;">Dilution</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td></td> </tr> <tr style="background-color: #e0f0ff;"> <td style="font-size: x-small;">Glc(f) + NADP/ATP</td> <td style="font-size: x-small;">A(340 nm)=0.200</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center; padding: 10px;"> Nächster Schritt: Glc(f) + HK/G6P-DH Weiter mit <START/ENTER> </td> </tr> <tr> <td style="font-size: x-small;">2002: Glc(f) 716 251, 10mm 10 mm</td> <td style="text-align: right; font-size: x-small;">Glucose 0.04 - 0.80 g/L</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="font-size: x-small; background-color: #333; color: white;">Einstellungen</td> <td style="font-size: x-small; background-color: #333; color: white;">Wiederholen</td> <td style="font-size: x-small; background-color: #333; color: white;">Abbrechen</td> </tr> </table> </div>	Spezial / Multi-Wellenlängen	29.06.15 15:33	START - ENTER	Dilution	1		Glc(f) + NADP/ATP	A(340 nm)=0.200		Nächster Schritt: Glc(f) + HK/G6P-DH Weiter mit <START/ENTER>			2002: Glc(f) 716 251, 10mm 10 mm	Glucose 0.04 - 0.80 g/L		Einstellungen	Wiederholen	Abbrechen
+ 0,020 ml	Reagenz 2, G6P-DH und HK																								
mischen																									
10 - 15 min.	Reaktionszeit																								
Spezial / Multi-Wellenlängen	29.06.15 15:33	START - ENTER																							
Dilution	1																								
Glc(f) + NADP/ATP	A(340 nm)=0.200																								
Nächster Schritt: Glc(f) + HK/G6P-DH Weiter mit <START/ENTER>																									
2002: Glc(f) 716 251, 10mm 10 mm	Glucose 0.04 - 0.80 g/L																								
Einstellungen	Wiederholen	Abbrechen																							
<p style="text-align: center;">2. Extinktionsmessung Glc(f) + HK/G6P-DH</p> <p>Messung der D-Glucose nach Zugabe von Reagenz 2</p>	<p style="text-align: center;">Küvette in den Küvetenschacht stellen; die Messung wird automatisch gestartet.</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="font-size: small;">Spezial / Multi-Wellenlängen</td> <td style="text-align: right; font-size: small;">29.06.15 13:27</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: right; color: orange; font-size: x-small;">[ZERO 29.06.15 13:25]</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center; padding: 10px;"> Glc(f) + HK/G6P-DH Messung mit <START/ENTER> starten </td> </tr> <tr> <td style="font-size: x-small;">2002: Glc(f) 716 251, 10mm 10 mm</td> <td style="text-align: right; font-size: x-small;">Glucose 0.04 - 0.80 g/L</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="font-size: x-small; background-color: #333; color: white;">Einstellungen</td> <td style="font-size: x-small; background-color: #333; color: white;">Abbrechen</td> <td></td> </tr> </table> <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">  </div> </div> <p style="text-align: center;">Nach der Messung Küvette aus dem Küvetenschacht nehmen.</p> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">  </div>	Spezial / Multi-Wellenlängen	29.06.15 13:27			[ZERO 29.06.15 13:25]		Glc(f) + HK/G6P-DH Messung mit <START/ENTER> starten			2002: Glc(f) 716 251, 10mm 10 mm	Glucose 0.04 - 0.80 g/L		Einstellungen	Abbrechen										
Spezial / Multi-Wellenlängen	29.06.15 13:27																								
	[ZERO 29.06.15 13:25]																								
Glc(f) + HK/G6P-DH Messung mit <START/ENTER> starten																									
2002: Glc(f) 716 251, 10mm 10 mm	Glucose 0.04 - 0.80 g/L																								
Einstellungen	Abbrechen																								
<p>Weiter mit: „Leerwert - Bestimmung“</p>																									

Leerwertbestimmung

Leerwert	Photometer								
<p>In eine leere 10 mm Rechteckküvette werden gegeben:</p>  <table border="1" style="width: 100%; margin-top: 10px;"> <tr> <td style="width: 15%;">1,000 ml</td> <td>Reagenz 1, NADP und ATP</td> </tr> <tr> <td>+2,000 ml</td> <td>bidest. Wasser</td> </tr> <tr> <td>mischen</td> <td></td> </tr> <tr> <td>3 min.</td> <td>Reaktionszeit</td> </tr> </table>	1,000 ml	Reagenz 1, NADP und ATP	+2,000 ml	bidest. Wasser	mischen		3 min.	Reaktionszeit	
1,000 ml	Reagenz 1, NADP und ATP								
+2,000 ml	bidest. Wasser								
mischen									
3 min.	Reaktionszeit								
<p style="text-align: center;">3. Extinktionsmessung</p> <p style="text-align: center;">BV + NADP/ATP</p> <p>Messung des Leerwertes nach Zugabe von Reagenz 1 und bidestilliertem Wasser</p>	<p style="text-align: center;">Küvette in den Küvetenschacht stellen; die Messung wird automatisch gestartet.</p>  <p style="text-align: center;">Nach der Messung die Küvette mit der Analysenlösung zur Weiterbearbeitung aus dem Küvetenschacht nehmen.</p> 								
<p>In dieselbe Küvette werden gegeben:</p> 									

+ 0,020 ml	Reagenz 2, G6P-DH und HK	
mischen		
10 - 15 min.	Reaktionszeit	

<p>4. Extinktionsmessung BV + HK/G6P-DH</p> <p>Messung des Leerwertes nach Zugabe von Reagenz 2</p>	<p>Küvette in den Küvetenschacht stellen; die Messung wird automatisch gestartet.</p> 
---	---

 <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">Das Ergebnis wird angezeigt</p>	
---	--

Teil 3	Methodenparameter und Formeldesign
--------	------------------------------------

Konzentrationsberechnung

$$c = \frac{V \cdot MG}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E \quad \left[\frac{g}{L} \right]$$

Hierbei gilt:

c	Ergebnis	
V	Testvolumen [ml] Analysenlösung	3,020 ml
MG	Molgewicht Glucose	180,16 g/mol
ε	Molarer Extinktionskoeffizient (NADPH)	Bei 340 nm = 6,3 [L / mmol / cm]
d	Schichtdicke	1,00 cm (10 mm)
v	Probenvolumen [ml]	0,100 ml
1000	Divisor für die Ergebnisanzeige in g/L	
ΔE	Extinktionsdifferenzen von Probe und Leerwert	ΔE = (E2-E1) _{Probe} - (E2-E1) _{Leerwert}
[g/L]	Dimension des Ergebnisses	

Potometrischer Faktor (F) und Messbereich

Rechteckküvette 10 mm bei 340 nm	
F = 0,864	$F = \frac{3,02 \cdot 180,16}{6,3 \cdot 1,00 \cdot 0,100 \cdot 1000} = 0,864$
Messbereich: 0,08 – 0,5 g/L Glucose	

Formeldesign

Die Reihenfolge der Extinktionsmessungen folgt dem Schema des Test-Herstellers.

Die Reihenfolge der Messungen der Formel-Variablen innerhalb der Photometer Programmierung folgt dem Index der Formel-Variablen in aufsteigender Richtung.

Für die Anordnung der Formel-Variablen im Ablauf Schema der praktischen Durchführung gibt es verschiedene Möglichkeiten. In dieser Dokumentation wird davon lediglich eine Variante berücksichtigt.

Glukose Berechnung
Extinktionsdifferenzen

$$\Delta E_{Glc} = (E2_{Glc} - E1_{Glc}) - (E2_{Leerwert} - E1_{Leerwert})$$

Hierbei gilt:

Messung	
ΔE _{Glc}	Differenz der Extinktionsmessungen
E1 _{Glc}	1. Absorptionsmessung der Probe
E2 _{Glc}	2. Absorptionsmessung der Probe
E1 _{Leerwert}	1. Absorptionsmessung des Leerwertes
E2 _{Leerwert}	2. Absorptionsmessung des Leerwertes

Für die Berechnung der Extinktionsdifferenzen und Berücksichtigung des photometrischen Faktors sowie einer möglichen Messbereichserweiterung durch Vorverdünnung kann die erweiterte Formel für die Programmierung des Photometers folgendermaßen aussehen:

$$R = 0,864 * ((A_{340nm_2} - A_{340nm}) - (A_{340nm_4} + A_{340nm_3})) * K_1$$

Wobei:

R	Ergebnis in g/L
0,864	Photometrischer Faktor bei der Glucose Bestimmung in der 10 mm Rechteckküvette bei 340 nm.
A _{340nm}	1. Formelvariable, Index = 1; entspricht: E1 _{Glc}
A _{340nm_2}	2. Formelvariable; Index = 2; entspricht: E2 _{Glc}
A _{340nm_3}	3. Formelvariable; Index = 3; entspricht: E1 _{Leerwert}
A _{340nm_4}	4. Formelvariable; Index = 4; entspricht: E2 _{Leerwert}
K ₁	Verdünnungs- / Multiplikationsfaktor

Teil 4	Programmierung der Methode
--------	----------------------------

Bei der manuellen Eingabe der Programmdaten für eine neue Methode zur Bestimmung von Glucose, folgende Werte einstellen:

Methode bearbeiten	29.06.15 18:25			
Nummer	2002			
Name	Glc(f) 716 251, 10mm			
Version	1			
Zitierform	Glucose			
Einheit	g/L			
Auflösung	0.01			
Küvette	10 mm			
Messbereich Untergrenze	0.04 g/L			
Messbereich Obergrenze	0.80 g/L			
<table border="1"> <tr> <td>Methodenliste</td> <td>Löschen</td> <td>Weiter</td> </tr> </table>		Methodenliste	Löschen	Weiter
Methodenliste	Löschen	Weiter		

Wert	Eingabe **	Beschreibung
Nummer *	Geräteabhängig	Listenummerierung, beliebig wählbar in diesem Bereich, jede Zahl in diesem Bereich kann jedoch nur einmal vergeben werden.
Name *	Glc(f) 716 251, 10mm	Bezeichnung des Verfahrens für Listenauswahl; beliebig wählbar, Glc = Glucose; 716 251 Bestellnummer des Herstellers, 10mm = Programmierung für 10 mm Rechteckküvette, max. 20 Zeichen;
Version *	1	Angabe des Programmierers, max. 5 Zeichen
Zitierform *	Glucose	Bezeichnung des Ergebnisses, max. 15 Zeichen
Einheit *	g/L	Konzentrationsangabe des Ergebnisses in g/L, max. 10 Zeichen
Auflösung	0.01	2 Nachkommastellen für die Anzeige des Ergebnisses, Auswahl aus vorgegebener Liste

Küvette	10 mm	Auswahl aus vorgegebener Liste
Messbereich Untergrenze *	0.08 g/L	niedrigster sinnvoller Messwert
Messbereich Obergrenze *	0.50 g/L	höchster sinnvoller Messwert

Wellenlänge		29.06.15 18:27
Wellenlänge 1	<input type="text" value="340 nm"/>	
Zurück	Hinzufügen	Weiter

Wellenlänge 1	340 nm	Alle Messungen erfolgen bei dieser Wellenlänge
---------------	--------	--

Ablaufvariablen		29.06.15 18:29	
K1	<input type="text" value="Dilution"/>		
Zurück	Hinzufügen	Löschen	Weiter

Ablaufvariablen	Beschriftung	Beschreibung
K1 *	Dilution	Messbereichserweiterung; der Multiplikations- / Verdünnungs-Faktor mit dem das Ergebnis multipliziert wird wenn eine Vorverdünnung der Probe vorgenommen wurde. Beschriftung: max 10 Zeichen. Der Wert wird zur Laufzeit der Methode vom Anwender eingegeben. (max. 10 Ablaufvariablen)

Formeleingabe	29.06.15 18:30		
$R = 0.86 \cdot ((A_{340 \text{ nm}_2} - A_{340 \text{ nm}}) - (A_{340 \text{ nm}_4} - A_{340 \text{ nm}_3})) \cdot K_1$			
Zurück	Operatoren	Variablen	Weiter

Berechnungsformel **	Eingabe von Zahlen, Variablen und Operatoren über die Tastatursteuerung des Photometers oder über eine externe USB-Tastatur. (mehr als 250 Zeichen möglich)
$R = 0.864 \cdot ((A_{340 \text{ nm}_2} - A_{340 \text{ nm}}) - (A_{340 \text{ nm}_4} - A_{340 \text{ nm}_3})) \cdot K_1$	

Bedingung	29.06.15 18:31		
$((A_{340 \text{ nm}_2} - A_{340 \text{ nm}}) - (A_{340 \text{ nm}_4} - A_{340 \text{ nm}_3})) > 0.1$			
Zurück	Operatoren	Variablen	Weiter

Bedingung **	Nach Boehringer Mannheim: Die gemessenen Extinktionsdifferenzen sollten zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses mindestens 0.100 Extinktionseinheiten betragen.
	$((A_{340 \text{ nm}_2} - A_{340 \text{ nm}}) - (A_{340 \text{ nm}_4} - A_{340 \text{ nm}_3})) > 0.1$
	oder
	$R > 0.08$

Methode bearbeiten	29.06.15 18:33
Sequenz	Bezeichnung
Messung 1	Glc(f) + NADP/ATP
Messung 2	Glc(f) + HK/G6P-DH
Messung 3	BV + NADP/ATP
Messung 4	BV + HK/G6P-DH
Zurück	Weiter

Bezeichnung	Beschriftung	Beschreibung (max. 20 Zeichen)
Messung 1 *	Glc(f) + NADP/ATP	1. Absorptionsmessung, Probe nach Zugabe des NADP Reagenzes.
Messung 2 *	Glc(f) + HK/G6P-DH	2. Absorptionsmessung, Probe nach Zugabe von Hexokinase.
Messung 3 *	BV + NADP/ATP	3. Absorptionsmessung, Leerwert nach Zugabe des NADP Reagenzes.
Messung 4 *	BV + HK/G6P-DH	4. Absorptionsmessung, Leerwert nach Zugabe von Hexokinase.

* Einstellungen und Beschriftungen sind frei wählbar; Anzahl der Zeichen ist begrenzt.

** Das Dezimaltrennzeichen bei der Zahleneingabe ist der Punkt ,‘