

**Τίτλος:** Πρωτόκολλο για τον φωτομετρικό προσδιορισμό και ποσοτικοποίηση της ρεμπαουδιοσίδης Α

**Αρχή μεθόδου** Η μέθοδος βασίζεται στην όξινη υδρόλυση υπό θέρμανση της ρεμπαουδιοσίδης Α με σκοπό την απελευθέρωση των μονάδων γλυκόζης από το μόριό της. Στη συνέχεια, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ρεμπαουδιοσίδης Α γίνεται μέσω του φωτομετρικού προσδιορισμού της γλυκόζης με την ενζυματική μέθοδο GOD/PAP. Τα δείγματα γλυκοζιτών στεβιόλης συχνά διατίθενται στην αγορά σε συνδυασμό με γλυκαντικά ηπιότερου γευστικού προφίλ, εξαιτίας της ισχυρής γλυκαντικής τους ικανότητας. Ένα από αυτά τα γλυκαντικά μπορεί να είναι και η γλυκόζη. Για το λόγο αυτό, η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της ρεμπαουδιοσίδης Α περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων με το σύστημα ενζύμων εξοκινάση της γλυκόζης/δεϋδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν προ υπάρχουσας ποσότητας γλυκόζης στα προς ανάλυση δείγματα, καθώς η παρουσία της θα αποτελούσε παρεμβολή για την ακριβή ποσοτικοποίηση της ρεμπαουδιοσίδης Α. Το σύστημα ενζύμων της μεθόδου της εξοκινάσης απενεργοποιείται στις συνθήκες όξινης υδρόλυσης υπό θέρμανση της ρεμπαουδιοσίδης Α, συνεπώς δεν επηρεάζει τη συγκέντρωση της γλυκόζης που απελευθερώνεται κατά την υδρόλυση.

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ**  
**ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**Τεχνικό φυλλάδιο**

**Υλικά/  
Εξοπλισμός**

- Πρότυπη ουσία ρεμπαουδιοσίδης Α γνωστής καθαρότητας
- Κιτ εξοκινάσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης της εταιρείας Medicon
- Κιτ GOD/PAP για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης της εταιρείας Biosis
- Υπερκάθαρο νερό
- Θειικό οξύ καθαρότητας reagent grade ή υψηλότερης
- Υδατόλουτρο
- Αναλυτικός ζυγός 4 δεκαδικών ψηφίων
- Αυτόματες πιπέτες 100-1000 μl
- Περιέκτες Eppendorf
- Φωτόμετρο ορατού/υπεριώδους

**Διαλύματα**

- Θειικό οξύ 10% v/v σε υπερκάθαρο νερό
- Δείγματα πρότυπης ουσίας ρεμπαουδιοσίδης Α συγκεντρώσεων (1.50, 1.20, 0.90, 0.60, 0.45, 0.30) mg/ml σε υπερκάθαρο νερό για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς
- Διάλυμα εργασίας εξοκινάσης παρασκευασμένο σύμφωνα με τις οδηγίες του κιτ
- Διάλυμα εργασίας GOD/PAP παρασκευασμένο σύμφωνα με τις οδηγίες του κιτ
- Διάλυμα των προς ανάλυση δειγμάτων παρασκευασμένα σε συγκεντρώσεις εντός των ορίων της καμπύλης αναφοράς, με βάση την αναμενόμενη περιεκτικότητα του σε ρεμπαουδιοσίδη Α (σε περίπτωση που δεν υπάρχουν στοιχεία για την περιεκτικότητα σε ρεμπαουδιοσίδη Α, είναι απαραίτητη η παρασκευή διαλυμάτων κλιμακούμενων συγκεντρώσεων)

**Μέθοδος**

Στα διαλύματα του προτύπου ρεμπαουδιοσίδης Α και των δειγμάτων προς ανάλυση προστίθεται το διάλυμα εργασίας του κιτ της εξοκινάσης σε αναλογία 500μl/ml. Στη συνέχεια επωάζονται για 45 λεπτά στους 37°C. Έπειτα από την ολοκλήρωση της επώασης, και αφού τα διαλύματα αφεθούν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου, προσδιορίζεται η συγκέντρωσή τους σε γλυκόζη πριν τη διαδικασία της όξινης υδρόλυσης υπό θέρμανση της ρεμπαουδιοσίδης Α. Ο προσδιορισμός της γλυκόζης επιτυγχάνεται με την ενζυματική μέθοδο GOD/PAP, σύμφωνα με τις οδηγίες του κιτ.

Στη συνέχεια, στα διαλύματα προστίθεται το διάλυμα θειικού οξέος 10% v/v σε αναλογία 150μl/ml και επωάζονται στους 100°C για 60 λεπτά. Αφού τα δείγματα επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου, η ποσότητα γλυκόζης η οποία απελευθερώθηκε από τα μόρια ρεμπαουδιοσίδης Α προσδιορίζεται με τη μέθοδο GOD/PAP με βάση τις οδηγίες του κιτ.

**Υπολογισμοί**

Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων σε ρεμπαουδιοσίδη Α επιτυγχάνεται μέσω της καμπύλης αναφοράς που παρασκευάζεται με τις γνωστές συγκεντρώσεις των δειγμάτων προτύπου ρεμπαουδιοσίδης Α ως προς την απορρόφηση στα 510nm, σύμφωνα με τις οδηγίες του κιτ GOD/PAP.

**Τεχνικά**

**χαρακτηριστικά**

Η φωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού της ρεμπαουδιοσίδης Α με όξινη υδρόλυση υπό θέρμανση έχει συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης  $R^2 > 0.99$ , συστηματικό λάθος %bias < 10%, LOD ίσο με 0.010 και LOQ ίσο με 0.039.