

UV-Test zur Bestimmung von D-Gluconsäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
Test-Kombination für 50 Bestimmungen

Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

1. Testprinzip

Enzymatische UV-Bestimmung von D-Gluconsäure und D-Glucono-delta-lacton mit Gluconatkinase (GK), ADP-abhängiger Hexokinase (ADP-HK) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH).

D-Gluconsäure + ATP $\xrightarrow{\text{GK}}$ D-Gluconat-6-Phosphat + ADP

ADP + D-Glucose $\xrightarrow{\text{ADP-HK}}$ D-Glucose-6-Phosphat + AMP

D-Glucose-6-Phosphat + NAD⁺ $\xrightarrow{\text{G6P-DH}}$

D-Glucono-delta-lacton-6-Phosphat + NADH + H⁺

Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) wird dabei zu NADH reduziert. Die gebildete NADH-Menge ist proportional zur gebildeten D-Gluconsäure Menge und wird bei 340 nm gemessen.

2. Reagenzien

2.1. Inhalt & Zusammensetzung

Der Test ist für eine manuelle und automatisierte Abarbeitung geeignet. Die Reagenzien reichen bei manueller Abarbeitung für 50 Bestimmungen. Die Anzahl der Bestimmungen bei automatisierter Abarbeitung ist um ein Vielfaches erhöht, jedoch geräteabhängig.

- Reagenz 1: 2 x 50 ml mit Puffer, NAD
- Reagenz 2: 2 x 12,5 ml mit Puffer, ADP-HK, G6P-DH, GK

2.2. Reagenzienvorbereitung

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig und müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) gebracht werden. Komponenten nicht zwischen Kits verschiedener Chargen austauschen.

2.3. Lagerung & Haltbarkeit

Die Reagenzien sind bei sachgerechter Handhabung auch nach dem Öffnen bei 2 - 8 °C bis zum Monatsende der angegebenen Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren.

2.4. Sicherheit & Entsorgung

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Chemikalien sind zu beachten. Nicht verschlucken sowie Berührung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten sind den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu entnehmen. Nach Gebrauch können die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgt und das Verpackungsmaterial dem Recycling zugeführt werden.

3. Probenvorbereitung

- Die Probenvorbereitung für die manuelle und die automatisierte Testdurchführung ist identisch.
- Die Proben sollten vor der Messung auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen mit dest. Wasser auf eine Konzentration innerhalb des Messbereichs (siehe Leistungsdaten) im Test einsetzen.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Stark gefärbte Proben gegebenenfalls entfärben.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Zur Klärung proteinhaltiger Proben empfiehlt sich eine Aufarbeitung mit Perchlorsäure oder Trichloressigsäure.
- Stark fetthaltige Proben in einen Messkolben einwiegen und mit heißem Wasser extrahieren; Probelösung zur Fettabscheidung abkühlen lassen (z. B. 15 min im Eisbad); Messkolben bis zur Marke mit Wasser auffüllen, wässrige Lösung vor dem Testen filtrieren.
- Proben mit niedrigem pH-Wert mit 5 M Natriumhydroxidlösung auf einen pH-Wert von 10 - 11 einstellen.

4. Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
Temperatur: 20 - 37 °C (während der Messung)
Messung: gegen Luft (ohne Küvette) oder Wasser
Messbereich: 6 - 1500 mg/l

	Reagenzleerwert	Probe / Kontrolle
Reagenz 1	2000 µl	2000 µl
Probe / Kontrolle	-	100 µl
Dest. Wasser	100 µl	-
Mischen, 3 min bei 20 - 37 °C inkubieren. Extinktion E ₁ messen, dann Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, 10 min bei 20 - 37 °C inkubieren und Extinktion E ₂ messen.		

Der Reagenzleerwert muss bei jedem Lauf einmalig mitbestimmt und von jedem Probenergebnis abgezogen werden.

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probelösungen

5.1.1. Konzentration D-Gluconsäure

$$\Delta E = (E_2 - df \times E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - df \times E_1)_{\text{RLW}}$$

df: Dilution factor (Reagenzverdünungsfaktor)

RLW: Reagenzleerwert

$$df = \frac{\text{Probenvolumen} + R1}{\text{Testvolumen}} = 0,808$$

Eine Erhöhung des Probenvolumens (bis max. 1000 µl) bei unveränderten Reagenzvolumina erfordert Umrechnung des Reagenzverdünungsfaktors (df). Bei Erhöhung des Volumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es dies Matrix-abhängig zu überprüfen.

$$C_{\text{D-Gluconsäure}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(E \times d \times v \times 1000)} = 0,809 \times \Delta E$$

V:	Testvolumen Basisapplikation [ml]	= 2,600
MG:	Molekulargewicht [g/mol]	= 196,16
d:	Schichtdicke [cm]	= 1,00
v:	Probenvolumen [ml]	= 0,100
ε:	Extinktionskoeffizient NADH [l/mmol x cm]	= 6,3 (bei 340 nm)

5.2. Berechnung bei Feststoffen

$$\text{Gehalt}_{\text{D-Gluconsäure}} [\text{g}/100 \text{ g}] = \frac{C_{\text{D-Gluconsäure}} [\text{g/l Probelösung}]}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ in g/l Probelösung}} \times 100$$

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir Enzytec™ Liquid Multi-Acid Standard low (E8460).

Die Wiederfindung des Enzytec™ Liquid Multi-Acid Standard low sowie anderen wässrigen Kontrolllösungen sollten innerhalb 100 ± 5 % liegen.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität

Der Test ist spezifisch für D-Gluconsäure.

6.2. Interferenzen & Nebenaktivitäten

In Gegenwart von D-/L-Äpfelsäure sowie D-/L-Weinsäure und meso-Weinsäure wurden unter 6,25 g/l keine Interferenzen ermittelt. Sulfit zeigte bei oder unter einer Konzentration von 0,5 g/l keine Interferenzen.

Der Test zeigt keine Nebenaktivitäten mit anderen relevanten Säuren.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Die Linearität ist bis 2500 mg/l D-Gluconsäure gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 6 und 1500 mg/l (100 µl Probenvolumen) liegt.

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung für ein Probenvolumen von $v = 100 \mu\text{l}$ ermittelt. Hieraus ergibt sich ein LoD von 1,5 mg/l. Bei einem Probenvolumen von $v = 1000 \mu\text{l}$ ergibt sich ein LoD von 0,25 mg/l.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde mittels Präzisionsprofil ermittelt und beträgt 6 mg/l (100 µl Probenvolumen).

Auf Basis von einer Extinktionsdifferenz $\Delta E = 0,010$ und einem Probenvolumen von 1000 µl ergibt sich ein errechneter LoQ von 1,09 mg/l.

6.4. Automatisierung mittels Pictus 500

6.4.1. Bestimmungsgrenze (LoQ)

P500 Applikation	LoQ
High Range	60 mg/l
Basic Range	12,5 mg/l
Sensitive Range	2 mg/l

6.4.2. Messbereiche

P500 Applikation	Messbereich
High Range	bis 9375 mg/l
Basic Range	bis 1875 mg/l
Sensitive Range	bis 187,5 mg/l

6.4.3. Präzision und Richtigkeit

Hier dargestellt sind Daten der Messung einer wässrigen Lösung.

High Range

Zielkonzentration, mg/l	500	1200
Mittelwert, mg/l	483	1161
SD, mg/l	5,60	6,70
RSD, %	1,16	0,58
Wiederfindung, %	96,5	96,7

Basic Range

Zielkonzentration, mg/l	500	1200
Mittelwert, mg/l	479,9	1172
SD, mg/l	2,47	3,85
RSD, %	0,51	0,33
Wiederfindung, %	96,0	97,6

Sensitive Range

Zielkonzentration, mg/l	50	120
Mittelwert, mg/l	48,9	124,7
SD, mg/l	0,26	0,43
RSD, %	0,54	0,35
Wiederfindung, %	96,0	97,6

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ Liquid Validierungsberichte
- Enzytec™ Liquid Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid Excel-Auswertevorlagen
- Enzytec™ Liquid Troubleshooting-Handbuch

Sicherheitsdatenblätter (SDS) und Analysenzertifikate (CoA) sind in digitaler Form unter folgendem Link erhältlich

<https://eifu.r-biopharm.com/>



8. Dienstleistungen & technischer Support

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Leistungen:

- Kundenspezifisches Troubleshooting
- Daten- & Ergebnisanalyse
- Kunden-Workshops & Webinare
- Automatisierung: applikativer Support und technischer Service

9. Haftungsausschluss

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.