

# D-Gluconsäure/ D-Glucono-δ-lacton

## UV-Test

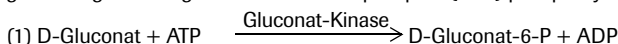
zur Bestimmung von D-Gluconsäure und D-Glucono-δ-lacton in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien

**Best. Nr. 10 428 191 035**

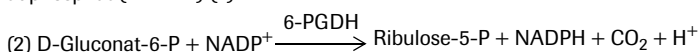
Test-Combination für 27 Bestimmungen

### Prinzip (Lit. 1)

D-Gluconsäure (D-Gluconat) wird in Gegenwart des Enzyms Gluconat-Kinase durch Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu D-Gluconat-6-phosphat unter gleichzeitiger Bildung von Adenosin-5'-diphosphat (ADP) phosphoryliert (1).

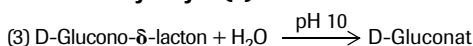


D-Gluconat-6-phosphat wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP) mittels 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6-PGDH) zu Ribulose-5-phosphat oxidiert. Es entsteht reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADPH) (2).



Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der D-Gluconat-Menge äquivalent. NADPH ist Messgröße und aufgrund seiner Absorption bei 340, 334 oder 365 nm zu bestimmen.

**G-Glucono-δ-lacton (GdL) wird nach demselben Prinzip nach alkalischer Hydrolyse (3) bestimmt.**



**Wenn keine alkalische Hydrolyse bei der Vorbereitung der Probe (s. unten) erfolgt, wird D-Glucono-δ-lacton unter den Bedingungen des Bestimmungsansatzes in ca. 50 min umgesetzt.**

### Die Test-Combination enthält

1. Flasche 1 mit ca. 4,5 g Pulvergemisch, zusammengesetzt aus: Triethanolaminpuffer, pH ca. 7,6; NADP, ca. 60 mg; ATP, ca. 150 mg; Magnesiumsulfat
2. Flasche 2 mit ca. 0,5 ml 6-PGDH-Suspension, ca. 110 U
3. Flasche 3 mit ca. 0,5 ml Gluconat-Kinase-Suspension, ca. 13 U

### Herstellung der Lösungen

1. Inhalt der Flasche 1 mit 27 ml bidest. Wasser lösen.
2. Inhalt der Flasche 2 unverdünnt verwenden.
3. Inhalt der Flasche 3 unverdünnt verwenden.

### Stabilität der Reagenzien

Der Inhalt der Flasche 1 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).  
Lösung 1 ist bei 2-8°C 4 Wochen, bei -15 bis -25°C 2 Monate haltbar.  
Lösung 1 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.  
Der Inhalt der Flaschen 2 und 3 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

### Bestimmungsansatz

Wellenlänge<sup>1</sup>: 340 nm, Hg 365 nm oder Hg 334 nm  
Glasküvette<sup>2</sup>: 1,00 cm Schichtdicke  
Temperatur: 20-25°C  
Testvolumen: 3,040 ml  
Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette) oder gegen Wasser  
Probelösung: 1-120 µg D-Gluconsäure und hydrolysiertes D-Glucono-δ-lacton/Testansatz<sup>3</sup> (in 0,100-2,000 ml Probevolumen)

1 Das Absorptionsmaximum von NADH liegt bei 340 nm. Bei Verwendung von Spektral-photometern wird im Absorptionsmaximum, bei Verwendung von Spektral-Linienphotometern mit Hg-Dampflampe bei einer Messstrahlung von 365 nm oder 334 nm gemessen.  
2 Anstelle von Glasküvetten sind auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.  
3 S. Hinweise zur Testdurchführung

**BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM**  
Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik

Nur zur Verwendung in der Lebensmittelhygiene.

Lagern bei 2-8°C

Methoden-Empfehlungen und standardisierte Verfahren siehe unter Literatur (2)

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Lösung 1	1,000 ml	1,000 ml
Probelösung*	-	0,100 ml
bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml
Suspension 2	0,020 ml	0,020 ml
mischen**, nach ca. 5 min Extinktionen der Lösungen messen (E <sub>1</sub> ). Reaktion starten durch Zugabe von		
Suspension 3	0,020 ml	0,020 ml
mischen**, Stillstand der Reaktion abwarten (ca. 20 min) und Extinktionen der Lösungen messen (E <sub>2</sub> ). Falls die Reaktion nach 20 min nicht zum Stillstand gekommen ist, Extinktionen weiter in 2 min-Abständen messen, bis eine konstante Extinktionszunahme pro 2 min erreicht ist.		

\* Vor der Dosierung der Probelösung Enzymtest-Messpipette bzw. Pipettenspitze der Kolbenhubpipette mit der Probelösung vorspülen.

\*\* Z. B. mit Rührspatel oder durch Umschwenken nach Verschliessen z. B. mit Parafilm (Warenzeichen der American Can Company, Greenwich, Ct., USA)

Bei konstanter Zunahme von E<sub>2</sub> wird die Extinktion auf die Zugabe von Suspension 3 (Gluconat-Kinase) extrapoliert.

Für Leerwert und Probe Extinktionsdifferenzen (E<sub>2</sub>-E<sub>1</sub>) bilden. Extinktionsdifferenz des Leerwerts von Extinktionsdifferenz der Probe abziehen.

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

Die gemessenen Extinktionsdifferenzen sollten zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Extinktionseinheiten betragen (s. "Hinweise zur Testdurchführung" und "Empfindlichkeit und Nachweisgrenze", Pkt. 4).

### Berechnung

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

$$c = \frac{V \times \text{MG}}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E \text{ [g/l]}$$

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient von NADPH bei:

$$\begin{aligned} 340 \text{ nm} &= 6,3 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}] \\ \text{Hg } 365 \text{ nm} &= 3,5 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}] \\ \text{Hg } 334 \text{ nm} &= 6,18 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}] \end{aligned}$$

Hieraus ergibt sich für D-Gluconsäure:

$$c = \frac{3,040 \times 196,1}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E = \frac{5,961}{\varepsilon} \times \Delta E \text{ [g D-Gluconsäure/l Probelösung]}$$

Ist bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen worden, muss das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert werden.

Bei der Analyse fester und halbfester Proben, die für die Vorbereitung der Probe eingewägt werden, wird das Analyseergebnis auf die Einwaage bezogen:

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

### Bestimmung von D-Glucono-δ-lacton

Probelösung mit Kalilauge (2 M) auf pH 10-11 einstellen und 5-10 min bei 20-25°C stehen lassen. pH-Wert der Lösung prüfen und ggf. nachstellen. Lösung zum Test (wie bei D-Gluconsäure) einsetzen.

D-Glucono-δ-lacton wird mit der ursprünglich vorliegenden D-Gluconsäure gemeinsam bestimmt und als Gesamt-D-Gluconsäure berechnet.

## Berechnung von D-Glucono- $\delta$ -lacton (GdL)

$$c = \frac{3,040 \times 178,1}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta A_{\text{GdL}} = \frac{5,414}{\epsilon} \times \frac{\Delta A_{\text{GdL}}}{[\text{D-Glucono-}\delta\text{-lacton/l Probelösung}]}$$

Eine Differenzierung zwischen D-Gluconsäure und D-Glucono- $\delta$ -lacton ist nicht möglich.

### 1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Menge an D-Gluconsäure und hydrolysiertem D-Glucono- $\delta$ -lacton zwischen 2  $\mu\text{g}$  und 120  $\mu\text{g}$  (Messung bei 365 nm) bzw. 1  $\mu\text{g}$  und 60  $\mu\text{g}$  (Messung bei 340, 334 nm) betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit zu verdünnen, dass die Konzentration an D-Gluconsäure und hydrolysiertem D-Glucono- $\delta$ -lacton zwischen 0,2 und 1,2 g/l bzw. 0,1 und 0,6 g/l liegt.

### Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge an D-Gluconsäure und hydrolysiertem D-Glucono- $\delta$ -lacton im Liter		Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor F
Messung bei			
340 or 334 nm	365 nm		
< 0,6 g	< 1,2 g	-	1
0,6-6,0 g	1,2-12,0 g	1 + 9	10
6,0-60 g	12,0-120 g	1 + 99	100
> 60 g	> 120 g	1 + 999	1000

Ist die gemessene Extinktionsdifferenz ( $\Delta\epsilon$ ) zu klein (z.B. <0,100), so ist die Probelösung erneut herzustellen (höhere Einwaage oder weniger starke Verdünnung), oder das in die Küvette zu pipettierende Probevolumen ( $v$ ) ist bis zu 2,000 ml zu erhöhen. Probelösung ggf. auf pH 7,5-8,0 einstellen. In diesem Fall ist das Volumen der hinzuzufügenden Wassermenge entsprechend zu verringern, so dass in den Ansätzen für Probe und Leerwert das gleiche Testvolumen vorliegt. Das geänderte Probevolumen  $v$  ist in der Berechnungsformel entsprechend zu berücksichtigen.

### 2. Technische Hinweise

Bei der Berechnung ist eindeutig anzugeben, ob die Ergebnisse als D-Gluconsäure (Molmasse 196,1 g/Mol) oder als D-Gluconat (Molmasse 195,1 g/Mol) angegeben werden. (Bei der enzymatischen Bestimmung wird das D-Gluconat-Ion gemessen.)

### 3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

Die Bestimmung ist spezifisch für D-Gluconsäure.

Bei der Analyse von reinen D-Gluconsäuresalzen (D-Gluconaten) ist mit Ergebnissen von über 100% zu rechnen wenn die Substanzen freie D-Gluconsäure enthalten und die Ergebnisse mit der Molmasse des entsprechenden D-Gluconats berechnet werden.

### 4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze (Lit. 1.2)

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen  $v = 2,000$  ml und Messung bei 340 nm einer D-Gluconsäure-Konzentration von 0,25 mg/l Probelösung (bei  $v = 0,100$  ml entsprechend 5 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von 0,5 mg/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,010 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probevolumen  $v = 2,000$  ml.

### 5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von 1  $\mu\text{g}$  D-Gluconsäure/Ansatz (0,5 mg D-Gluconsäure/l Probelösung; Probevolumen  $v = 2,000$  ml) und 120  $\mu\text{g}$  D-Gluconsäure/Ansatz (1,2 g D-Gluconsäure/l Probelösung; Probevolumen  $v = 0,100$  ml).

### 6. Präzision

Bei einer Doppelbestimmung von D-Gluconsäure, ausgehend von einer Probelösung, ist mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,005 bis 0,010 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probevolumen  $v = 0,100$  ml und Messung bei 340 nm einer D-Gluconsäure-Konzentration von 5-10 mg/l. (Ist bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen worden, ist mit dem Verdünnungsfaktor F zu multiplizieren. Bei einer Einwaage von 1 g Probe/100 ml = 10 g/l sind die zu erwartenden Unterschiede 0,05-0,1 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten veröffentlicht:

VK = 2 %	n = 12	Wurst	(Lit. 1.2)
Fleischwurst:			
x = 0,1 g/100 g	r = 0,012 g/100 g	$s_{(r)} = \pm 0,004$ g/100 g	
	R = 0,014 g/100 g	$s_{(R)} = \pm 0,005$ g/100 g	
Milch			
x = 0,362 g/100 g	r = 0,02 g/100 g	R = 0,08 g/100 g	
Feta-Käse:			
x = 2,57 g/100 g	r = 0,15 g/100 g	R = 0,26 g/100 g	(Lit. 2.3)

### 7. Erkennen von Störungen

- Ist die Umsetzung von D-Gluconsäure nach der unter "Bestimmungsansatz" angegebenen Zeit beendet, so kann im allgemeinen auf einen störungsfreien Ablauf geschlossen werden.
- Nach Ablauf der Reaktion kann durch Zugabe von D-Gluconsäuresalzen (qualitativ oder quantitativ) die Reaktion wieder gestartet werden: Die erneute Änderung der Extinktion nach Zugabe des Standardmaterials ist ein Beweis für den störungsfreien Ablauf der Bestimmung.
- Große Fehler beim Testansatz und Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können auch erkannt werden, wenn aus einer Probelösung eine Doppelbestimmung mit verschiedenen Probevolumina (z.B. 0,100 ml und 0,200 ml) ausgeführt wird: Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein. Bei der Analytik fester Proben wird die Einwägung verschiedener Mengen (z.B. 1 g und 2 g) in 100 ml-Messkolben empfohlen. Bei gleichen Probevolumina für die Testansätze muss Proportionalität zwischen Extinktionsdifferenz und Einwaage gegeben sein.
- Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können weiterhin durch Mitführen eines internen Standards erkannt werden: Neben Probe-, Leerwert- und Standardansatz wird ein weiterer Ansatz mit Probe- und Testkontroll-Lösung analysiert. Aus den ermittelten Extinktionsdifferenzen wird die Wiederfindung berechnet.
- Verluste während der Vorbereitung der Probe können durch Wiederfindungsversuche erkannt werden: Die Probe wird mit und ohne zugesetztem Standardmaterial vorbereitet und anschliessend gemessen. Der Zusatz muss (innerhalb des Analysenfehlers) quantitativ wiedergefunden werden.

### 8. Gefährlichkeit der Reagenzien

Die Reagenzien zur Bestimmung von D-Gluconsäure sind keine gefährlichen Stoffe oder Zubereitungen im Sinne der Gefahrstoffverordnung, des Chemikaliengesetzes oder der EG-Richtlinie 67/548/EWG und deren Änderungs- und Anpassungsrichtlinien. Die beim Umgang mit Chemikalien üblichen Vorsichtsmassnahmen sollten jedoch beachtet werden.

Nach Gebrauch können die Reagenzien unter Beachtung der örtlichen Vorschriften zum Abwasser gegeben werden. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

### 10. Allgemeine Hinweise zur Vorbereitung der Proben

**Flüssige, klare, farblose und annähernd neutrale Proben** direkt, nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle oder mit einem Probevolumen bis 2,000 ml zum Test einsetzen;

**trübe Lösungen** filtrieren;

**Kohlensäure-haltige Proben** (z.B. durch Filtration) entgasen;

**saure Proben** mit Kalilauge oder Natronlauge auf ca. pH 8 einstellen;

**saure und schwach gefärbte Proben** mit Kalilauge oder Natronlauge auf pH 8 einstellen und ca. 15 min stehen lassen;

**"stark gefärbte" Proben**, (falls erforderlich auf ca. pH 8 eingestellt) gegen Probeleerwert (= Puffer bzw. bidest. Wasser + Probe) messen (Photometer mit Probeleerwert im Strahlengang auf 0,000 einstellen);

**feste und halb feste Proben** zerkleinern oder homogenisieren, mit Wasser extrahieren bzw. lösen, wenn nötig filtrieren;

**Protein-haltige Proben** mit Perchlorsäure enteissen;

**Fett-haltige Proben** mit heissem Wasser extrahieren (Extraktionstemperatur über dem Schmelzpunkt des jeweiligen Fettes), zur Abscheidung des Fettes abkühlen lassen, Messkolben bis zur Marke auffüllen, 15 min in Eisbad stellen und filtrieren;

### 10. Anwendungsbeispiele

#### Bestimmung von D-Gluconsäure in Wein (Lit. 2.2, 3.1-3.7)

Wein zur Hydrolyse von D-Glucono- $\delta$ -lacton mit Kalilauge (2 M) auf pH 10-11 einstellen. 5-10 min bei 20-25°C stehen lassen. pH-Wert prüfen und ggf. nachstellen. Hierbei wird D-Glucono- $\delta$ -lacton in D-Gluconsäure überführt. Mit Wasser verdünnen (siehe Verdünnungstabelle) und zum Test einsetzen.

D-Glucono- $\delta$ -lacton wird mit D-Gluconsäure gemeinsam bestimmt und als Gesamt-D-Gluconsäure berechnet.

### Bestimmung von D-Gluconsäure bzw. D-Glucono- $\delta$ -lacton in Fleisch-Erzeugnissen (Lit. 2.1, 2.3)

Etwa 5 g homogenisierte Probe in einem Homogenisierungsbecher genau einwiegen, ca. 20 ml Perchlorsäure (1 M) hinzufügen und 10 min homogenisieren; Inhalt mit ca. 40 ml Wasser quantitativ in ein Becherglas spülen. Unter Rühren (Magnetrührer) mit Kalilauge (2 M) auf pH 10-11 einstellen. Mit Wasser Inhalt quantitativ in einen 100 ml-Messkolben spülen und bis zur Marke auffüllen, wobei darauf zu achten ist, dass die Fettschicht oberhalb, die wässrige Schicht an der Marke steht. Mischung umschütteln. Zur Abscheidung des Fettes und zur Ausfällung des Kaliumperchlorat-Niederschlages 20 min in den Kühlschrank stellen. Anschliessend filtrieren. Die ersten ml verwerfen. Klare, evtl. leicht trübe Lösung zum Test einsetzen.

Wegen der Volumenverdrängung durch unlösliche Anteile der Probe ist bei der Gehaltsberechnung das Ergebnis mit dem Volumenverdrängungsfaktor 0,98 zu multiplizieren.

### Bestimmung von D-Glucono- $\delta$ -lacton (GdL) in Kutterhilfsmitteln

Etwa 2 g Kutterhilfsmittel in ein 250 ml-Becherglas genau einwiegen, mit ca. 70 ml Wasser versetzen. Unter Rühren (Magnetrührer) mit Kalilauge (2 M) auf pH 10 einstellen. Mischung ca. 10 min stehen lassen, dann in einen 100 ml-Messkolben füllen. Mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Nach dem Mischen durch ein mit der Lösung angefeuchtetes Filterpapier filtrieren. Nahezu klare Lösung zum Test einsetzen, gegebenenfalls verdünnen (s. Verdünnungstabelle).

### 11. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch in der Forschung bei der Analytik von Pharmaka (Lit. 3.8) und biologischen Proben anwendbar. Zu Probenahme, Behandlung und Stabilität der Probe s. Lit. 1.

### Bestimmung von D-Gluconsäure in Fermentationsproben und Zellkulturmedien

Analysenprobe, ggf. nach Zentrifugation, zum Abstoppen enzymatischer Vorgänge 15 min in Wasserbad (80°C) stellen und anschliessend zentrifugieren. Überstand, ggf. gemäss Verdünnungstabelle verdünnt, zur Bestimmung einsetzen (alternativ kann auch eine Enteiweissung mit Perchlorsäure erfolgen; siehe die oben beschriebenen Anwendungsbeispiele).

Gallertartige Agar-Medien mit Wasser homogenisieren und wie oben beschrieben weiterbehandeln.

### Literatur

- Möllering, H. & Bergmeyer, H.U. (1967) Enzymatische Bestimmung von D-Gluconsäure in Lebensmitteln, Z. Lebensm. Unters. Forsch. **135**, 198-204
- Möllering, H. & Bergmeyer, H. U. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, 1288-1292, Verlag Chemie, Weinheim und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U. ed.) 2nd ed., vol. 3.p.1243-1247, Verlag Chemie, Weinheim/ Academic Press, Inc. New York and London.
- Möllering, H. & Bergmeyer, H. U. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3rd ed., vol. VI, pp. 220-227, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/ Florida, Basel
- International Standard ISO 4133 (Februar 1979) Meat and meat products - Determination of glucono-delta-lactone content (Reference method)
- Methodenbuch für Weinanalysen in Österreich (1980), herausgegeben von Arbeitsgemeinschaft der Landw. Versuchsanstalten in Österreich (ALVA)
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von D-Gluconsäure (D-Gluconat) in Fleischerzeugnissen, 07.00-16 (November 1981); Bestimmung von D-Gluconsäure (D-Gluconat) in Wurstwaren, 08.00-18 (November 1981); Bestimmung von D-Gluconsäure (D-Gluconat) in Milch und Milchprodukten, enzymatisches Verfahren, 01.00-63 (September 1997); Bestimmung von D-Gluconsäure (D-Gluconat) in Milchprodukten, enzymatisches Verfahren, 02.00-25 (September 1997); Bestimmung von D-Gluconsäure (D-Gluconat) in Käse, enzymatisches Verfahren, 03.00-28 (September 1997)
- Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau **77**, 5-6
- Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 30A (Wein aus Trauben)/6.9 (1994)
- Deutsche Norm DIN 10471 (Okt. 1997) Bestimmung von D-Gluconsäure (D-Gluconat) in Milch und Milchprodukten (Enzymatisches Verfahren)
- Standard der Russischen Föderation / Standard of the Russian Federation / GOSSTANDART ROSSII GOST R 51197-98 (1998) Meat and meat products. Method for determination of glucono- $\delta$ -lactone content
- Holbach, B. & Woller, R. (1976) über den Zusammenhang zwischen Botrytisbefall von Trauben und dem Glycerin- sowie Gluconsäuregehalt von Wein, Die Weinwissenschaft **31**, 202-214
- Holbach, B. & Woller, R. (1978) Der Gluconsäuregehalt von Wein und seine Beziehung zum Glycerin, Die Weinwissenschaft **33**, 114-125
- Holbach, B. & Woller, R. (1979) Zum Einfluss von Hefen auf Gluconsäure während der Gärung, Die Weinwirtschaft **60**, 1358-1359
- Holbach, B. & Woller, R. (1981) Versuche zum Abbau der Gluconsäure durch Hefen und Milchsäurebakterien, Die Weinwirtschaft **61**, 342-345
- Radler, F. & Schönig, I. (1978) Gluconsäurevergärung durch Milchsäurebakterien des Weines, Z. Lebensm. Unters. Forsch. **167**, 165-170
- Bandion, F., Roth, I., Mayr, E. & Valenta, M. (1980) Zur Beurteilung der Gluconsäuregehalte bei Wein im Hinblick auf mögliche Veränderungen während der Lagerung, Mitt. Klosterneuburg **30**, 32-36
- Hupf, H. (1982) Die Bedeutung der Gluconsäure in der Auslandsweinuntersuchung, Mitt. Lebensm. Chem. u. Gerichtl. Chem. **36**, 3-5
- Mayer, H., Keck, J., Ditzinger, G., Menschig, D. & Pfandl, A. (1991) Enzymatische Gluconsäure-Bestimmung zur Quantifizierung von Chlorhexidin-digluconat, Die Pharmazeutische Industrie **53**, 191-197.
- Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (1998) Ringversuche zur statistischen Bewertung der Zuverlässigkeit amtlicher Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG - 9.Mitteilung: Bestimmung von D-Gluconsäure (D-Gluconat) in Milch und Milchprodukten - Enzymatisches Verfahren, Bundesgesundheitsblatt 3/98, 140

# D-Gluconsäure-Testkontroll-Lösung

Die Testkontroll-Lösung dient zur Kontrolle für die enzymatische Bestimmung von D-Gluconsäuren in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien.

### Reagenzien

Natrium-D-gluconat, p.A. (M = 218,13 g/mol)  
Kalium-D-gluconat, p.A. (M = 234,25 g/mol)

### Herstellung der Testkontroll-Lösung

67 mg Natrium-D-gluconat, bzw. 72 mg Kalium-D-gluconat auf 0,1 mg genau einwiegen und im Messkolben mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen und gründlich mischen (entspricht ca. 0,6 g D-Gluconsäure/l).

Lösung vor Gebrauch frisch herstellen. Ggf. kann die Lösung portionsweise eingefroren werden.

### Anwendung:

#### 1. Zusatz der D-Gluconsäure-Testkontroll-Lösung zum Testansatz:

Die Testkontroll-Lösung wird anstelle der Probelösung zur Bestimmung eingesetzt. (Die Messung der Testkontroll-Lösung ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen.)

#### 2. "Quantitativer Nachstart":

Nach Ablauf der Reaktion mit Probelösung und Messung von  $E_2$  werden 0,050 ml der Testkontroll-Lösung zum Probeansatz gegeben. Nach Ablauf der Reaktion (ca. 30 min) wird die Extinktion  $E_3$  gemessen. Aus der Differenz ( $E_3 - E_2$ ) wird nach der allgemeinen Berechnungsformel die Konzentration berechnet. Hierbei ist das geänderte Gesamtvolumen zu berücksichtigen.

Wegen der Verdünnung des Testansatzes durch die Zugabe der Testkontroll-Lösung weicht das Ergebnis geringfügig von dem Ergebnis ab, das gemäss Pkt. 1 ermittelt wurde.

### 3. Interner Standard:

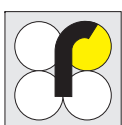
Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung (keine groben Fehler bei Testansatz; Probe ist frei von Hemmsubstanzen) kann die Testkontroll-Lösung als interner Standard verwendet werden:

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe	Standard	Probe + Standard
Lösung 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Probelösung	-	0,100 ml	-	0,050 ml
Testkontroll-Lsg.	-	-	0,100 ml	0,050 ml
bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	1,900 ml
Suspension	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml

mischen, nach ca. 5 min Extinktionen der Lösungen messen ( $E_1$ ). Weiter verfahren wie im Arbeitsschema bei „Bestimmungsansatz“ angegeben. Die entsprechenden Fussnoten und "Hinweise zur Testdurchführung" sind zu beachten.

Die Wiederfindung des Standards berechnet sich nach:

$$\text{Wiederfindung} = \frac{2 \times \Delta E_{\text{Probe}} + \text{Standard} - \Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}} \times 100 [\%]$$



R-BIOPHARM AG  
An der neuen Bergstraße 17  
D-64297 Darmstadt  
Telefon + 49 61 51 / 81 02-0  
Fax + 49 61 51 / 81 02-20  
www.r-biopharm.com

