

Harnstoff/Ammoniak

UV-Test

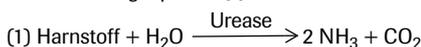
zur Bestimmung von Harnstoff und Ammoniak in Lebensmitteln und anderen Probematerialien, sowie zur Bestimmung von Stickstoff nach Kjeldahl-Aufschluss (s. Pkt. 12.2)

Best. Nr. 10 542 946 035

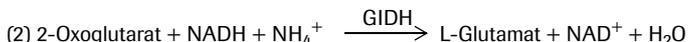
Test-Combination für je ca. 25 Bestimmungen

Prinzip (Lit. 1)

Harnstoff wird in Gegenwart des Enzyms Urease zu Ammoniak und Kohlendioxid gespalten (1).



Ammoniak setzt 2-Oxoglutarat in Gegenwart von Glutamat-Dehydrogenase (GIDH) und reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) zu L-Glutamat um, wobei NADH verbraucht wird (2).



Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Ammoniak-Menge bzw. der halben Harnstoff-Menge äquivalent. NADH ist Messgrösse und aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm zu bestimmen.

Die Test-Combination enthält

1. Flasche 1 mit ca. 60 ml Lösung, zusammengesetzt aus: Triethanolaminpuffer, pH ca. 8,0; 2-Oxoglutarat, ca. 220 mg
2. Flasche 2 mit ca. 50 Tabletten; jede Tablette enthält: NADH, ca. 0,4 mg
3. Flasche 3 mit ca. 0,7 ml Urease-Lösung, ca. 80 U
4. Flasche 4 mit ca. 1,2 ml Glutamat-Dehydrogenase-Lösung, ca. 1000 U

Herstellung der Lösungen

1. Inhalt der Flasche 1 unverdünnt verwenden.
2. In einem Becherglas oder Reagenzglas je nach Anzahl der Bestimmungen für jeden Test (Leerwert und Proben) **eine** Tablette aus Flasche 2 mit **einem** ml Lösung aus Flasche 1 lösen (zur Entnahme der Tabletten aus Flasche 2 Pinzette benutzen), ergibt Reaktionsgemisch 2.
3. Inhalt der Flasche 3 unverdünnt verwenden.
4. Inhalt der Flasche 4 unverdünnt verwenden.

Stabilität der Reagenzien

Lösung 1 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Lösung 1 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.

Tabletten 2 sind stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Reaktionsgemisch 2 ist bei 2-8°C 3 Tage haltbar.

Reaktionsgemisch 2 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.

Der Inhalt der Flasche 3 und 4 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Bestimmungsansatz

Wellenlänge¹: 340 nm, Hg 365 nm oder Hg 334 nm

Glasküvette²: 1,00 cm Schichtdicke

Temperatur: 20-25°C

Testvolumen: 3,040 ml

Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette) oder gegen Wasser

Probelösung: 0,3-14 µg Harnstoff/Ansatz³ oder

0,2-8 µg Ammoniak/Ansatz³
(in 0,100-2,000 ml Probevolumen)

In Küvetten pipettieren	Leerwert Harnstoff	Harnstoff Probe	Leerwert Ammoniak	Ammoniak Probe
Reaktionsgemisch 2	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Probelösung*	-	0,100 ml	-	0,100 ml
Lösung 3	0,020 ml	0,020 ml	-	-
bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml	2,020 ml	1,920 ml

mischen**, nach ca. 5 min bei 20-25°C Extinktionen der Lösungen messen (E₁). Reaktion starten durch Zugabe von

Lösung 4	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
----------	----------	----------	----------	----------

mischen**, Stillstand der Reaktion abwarten (ca. 20 min) und Extinktionen der Lösungen messen (E₂).

Falls die Reaktion nach 20 min nicht zum Stillstand gekommen ist, Extinktionen weiter in 2 min-Abständen messen, bis eine konstante Extinktionsabnahme pro 2 min erreicht ist.

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)

Bei konstanter Extinktionsabnahme von E₂ wird die Extinktion auf die Zeit der Zugabe von Lösung 4 (GIDH) extrapoliert.

Für Probe und Leerwert Extinktionsdifferenzen (E₁-E₂) berechnen. Extinktionsdifferenz des Leerwerts von Extinktionsdifferenz der jeweiligen Probe abziehen.

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

Man erhält $\Delta E_{\text{Harnstoff + Ammoniak}}$ (aus Harnstoff-Probe) und

$\Delta E_{\text{Ammoniak}}$ (aus Ammoniak-Probe)

Die Differenz dieser Werte ergibt $\Delta E_{\text{Harnstoff}}$

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

Ist die Extinktionsdifferenz der Proben (ΔE_{Probe}) grösser als 1,000 (gemessen bei 340, bzw. Hg 334 nm), bzw. 0,500 (gemessen bei Hg 365 nm), so ist die Konzentration von Harnstoff bzw. Ammoniak in der Probelösung zu hoch. Die Probelösung ist dann gemäss Verdünnungstabelle zu verdünnen.

Berechnung

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

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

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

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

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient von NADH bei:

$$340 \text{ nm} = 6,3 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Hg } 365 \text{ nm} = 3,4 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Hg } 334 \text{ nm} = 6,18 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

Hieraus ergibt sich für Harnstoff:

$$c = \frac{3,040 \times 60,06}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 2 \times 1000} \times \Delta E_{\text{Harnstoff}} = \frac{0,9129}{\varepsilon} \times \Delta E_{\text{Harnstoff}} \text{ [g Harnstoff/l Probelösung]}$$

für Ammoniak

$$c = \frac{3,040 \times 17,03}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E_{\text{Ammoniak}} = \frac{0,5177}{\varepsilon} \times \Delta E_{\text{Ammoniak}} \text{ [g Ammoniak/l Probelösung]}$$

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

- 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

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

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

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

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Menge an Harnstoff (Ammoniak) zwischen 0,3 µg und 14 µg (0,2 µg und 8 µg) betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit zu verdünnen, dass die Konzentration an Harnstoff (Ammoniak) zwischen 0,02 und 0,14 g/l (0,01 und 0,08 g/l) liegt.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge an Harnstoff (Ammoniak) in Liter	Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor F
< 0,14 g (< 0,08 g)	-	1
0,14-1,4 g (0,08-0,8 g)	1 + 9	10
1,4-14 g (0,8-8,0 g)	1 + 99	100

Ist die gemessene Extinktionsdifferenz (ΔE) 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 Probenvolumen (v) ist bis auf 2,000 ml zu erhöhen. 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 Probenvolumen v ist in der Berechnungsformel entsprechend zu berücksichtigen.

2. Technische Hinweise

- 2.1 Zum Test nur frisch destilliertes Wasser verwenden.
- 2.2 In ammoniakfreier Atmosphäre arbeiten (Rauchverbot im Labor beachten).

3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

Die Bestimmung ist spezifisch für Harnstoff und Ammoniak. Bei der Analyse der Reinsubstanzen Harnstoff und Ammoniumsulfat sind Ergebnisse von ca. 100% zu erwarten.

4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze (Lit. 1.4)

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probenvolumen $v = 2,000$ ml und Messung bei 340 nm einer Ammoniak-Konzentration von 0,02 mg/l bzw. einer Harnstoff-Konzentration von 0,04 mg/l Probelösung (bei $v = 0,100$ ml entsprechend 0,4 mg Ammoniak/l bzw. 0,8 mg Harnstoff/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von 0,08 mg Ammoniak/l bzw. 0,15 mg Harnstoff/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,020 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probenvolumen $v = 2,000$ ml.

5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von ca. 0,2 µg Ammoniak/Ansatz (0,08 mg Ammoniak/l Probelösung; Probenvolumen $v = 2,000$ ml) und 8 µg Ammoniak/Ansatz (0,08 g Ammoniak/l Probelösung; Probenvolumen $v = 0,100$ ml). bzw. von 0,3 µg Harnstoff/Ansatz (0,15 mg Harnstoff/l Probelösung; Probenvolumen $v = 2,000$ ml) bis 14 µg Harnstoff/Ansatz (0,14 g Harnstoff/l; Probenvolumen $v = 0,100$ ml).

6. Präzision

Ammoniak:
Bei einer Doppelbestimmung, ausgehend von einer Probelösung, ist mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,005 bis 0,010 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probenvolumen $v = 0,100$ ml und Messung bei 340 nm einer Ammoniak-Konzentration von ca. 0,4-1 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 ca. 0,004-0,01 g/100 g.)

In der Literatur sind für Ammoniak folgende Daten veröffentlicht:

VK = 1,6 %	(Plasma)	(Lit. 1.2)
VK = 0,88-1,16 %	(Ammoniumchlorid-Lösungen)	(Lit. 1.3)
VK = 0,34 %	(Ammoniumchlorid-Lösung)	
VK = 0,36-0,96 %	(Fleischproben)	(Lit. 3.2)

Harnstoff:

Bei einer Doppelbestimmung, ausgehend von einer Probelösung, ist mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,005 bis 0,015 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probenvolumen $v = 0,100$ ml und Messung bei 340 nm einer Harnstoff-Konzentration von ca. 0,7-2 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 ca. 0,007-0,02 g/100 g.)

In der Literatur sind für Harnstoff folgende Daten veröffentlicht:

VK = 2,7 %	(Serum)	(Lit. 1.1)
VK = 3 %	(Serum)	(Lit. 1.3)

Analyse von Badewasser:

$x = 0,611$ mg/l	$r = 0,1854$ mg/l	$S_{(r)} = \pm 0,066$ mg/l
	$R = 0,2145$ mg/l	$S_{(R)} = \pm 0,076$ mg/l
$x = 2,323$ mg/l	$r = 0,1247$ mg/l	$S_{(r)} = \pm 0,044$ mg/l
	$R = 0,1883$ mg/l	$S_{(R)} = \pm 0,067$ mg/l
$x = 5,749$ mg/l	$r = 0,0707$ mg/l	$S_{(r)} = \pm 0,025$ mg/l
	$R = 0,1707$ mg/l	$S_{(R)} = \pm 0,060$ mg/l

7. Störungen

Bei der in Lebensmitteln durchzuführenden Eiweissfällung mit Perchlorsäure entstehen gelegentlich Proteinbruchstücke, welche in Lösung bleiben und im alkalischen Puffermilieu allmählich Ammoniak bilden können, was zu Schleimreaktionen führt. Diese Ammoniak-Bildung ist sehr gering und lässt sich vom Ammoniak-Gehalt der Probe durch Extrapolation der Extinktion E_2 auf die Zeit der Zugabe von Lösung 4 (GIDH) abgrenzen und berechnen.

Die üblichen Lebensmittelinhaltsstoffe stören die Bestimmung von Ammoniak nicht. Lediglich hohe Konzentrationen von Gerbstoffen in Fruchtsäften können zu einer Verzögerung der GIDH-Reaktion führen. Daher sollten Fruchtsäfte stets mit PVPP behandelt werden.

Relativ hohe Konzentrationen von Schwermetallen erschweren durch Trübungsbildung eine zuverlässige Messung von Ammoniak. In den meisten Fällen können hohe Metallionen-Konzentrationen als Hydroxide durch Alkalisieren der Probelösung entfernt werden ($\text{pH} > 7,5$).

Zu Schwimmbadwasser-Proben zugesetztes Natriumthiosulfat stört den Test bis zu einer Menge von 1 mg/Ansatz nicht.

8. Erkennen von Störungen

- 8.1 Ist die Umsetzung von Harnstoff bzw. Ammoniak nach der unter "Bestimmungsansatz" angegebenen Zeit beendet, so kann im allgemeinen auf einen störungsfreien Ablauf geschlossen werden.
- 8.2 Nach Ablauf der Reaktion kann durch Zugabe von Harnstoff und/oder Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat (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.
- 8.3 Grobe Fehler beim Testansatz und Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können auch erkannt werden, wenn aus einer Probelösung eine Doppelbestimmung mit verschiedenen Probenvolumina (z.B. 0,100 ml und 0,200 ml) ausgeführt wird: Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probenvolumina 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 Probenvolumina für die Testansätze muss Proportionalität zwischen Extinktionsdifferenz und Einwaage gegeben sein.
- 8.4 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.
- 8.5 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.

9. Gefährlichkeit der Reagenzien

Die Reagenzien zur Bestimmung von Harnstoff und Ammoniak sind keine gefährliche 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 Natronlauge oder Kalilauge auf ca. pH 7-8 einstellen;

saure und schwach gefärbte Proben mit Kalilauge oder Natronlauge auf pH 7-8 einstellen und ca. 15 min stehen lassen;

„stark gefärbte“ Proben, die unverdünnt oder mit einem höheren Probevolumen zum Test eingesetzt werden, mit Polyvinylpyrrolidon, PVPP (2,5-5 g/100 ml) behandeln;

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;

Emulsionen mit Trichloressigsäure brechen.

Wichtiger Hinweis

Die Carrez-Klärung kann bei der Vorbereitung der Probe zur Harnstoff/Ammoniak-Bestimmung wegen zu geringer Wiederfindungsrate nicht angewendet werden (Adsorption von Harnstoff/Ammoniak).

11. Anwendungsbeispiele

Bestimmung von Ammoniak in Fruchtsäften

10 ml Fruchtsaft (klare, trübe oder gefärbte Säfte) - bei Erhöhung des Probevolumens (v) ggf. neutralisieren und dann mit Wasser auf 20 ml auffüllen - mit 0,5-1,0 g angefeuchtetem Polyvinylpyrrolidon (PVPP) in einem Becherglas versetzen und etwa 1 min rühren (Magnetrührer). Probelösung filtrieren und zum Test einsetzen.

Im Test lediglich Leerwert „Ammoniak“ und „Ammoniak-Probe“ messen.

Bestimmung von Harnstoff und Ammoniak in Wasser (Schwimmbad-Wasser)

Klare Probe zum Test einsetzen. Je nach entsprechender Konzentration Probelösung entweder verdünnen (s. Verdünnungstabelle) oder bis v = 2,000 ml Probevolumen zum Test einsetzen.

Bestimmung von Harnstoff in Milch

1 ml Milch mit 4 ml Trichloressigsäure (0,3 M) mischen. Niederschlag nach etwa 5 min abzentrifugieren (3 min, ca. 4000 Upm). 0,100 ml der überstehenden, klaren Lösung zum Test einsetzen.

Bestimmung von Ammoniak in Milch

1 ml Milch mit 4 ml Trichloressigsäure (0,3 M) mischen. Niederschlag nach etwa 5 min abzentrifugieren. Überstand dekantieren und mit KOH (10 M) neutralisieren, (Verdünnungsfaktor kann wegen der starken Konzentration der KOH vernachlässigt werden), filtrieren und 1,000 bis 2,000 ml Probelösung zum Test einsetzen.

Im Test lediglich Leerwert „Ammoniak“ und „Ammoniak-Probe“ messen.

Bestimmung von Ammoniak in Backwaren

Ca. 10 g zerkleinerte Probe in einen Homogenisierungsbecher genau einwiegen, etwa 20 ml Perchlorsäure (1 M) hinzufügen und ca. 2 min homogenisieren. Weiter verfahren, wie unter „Fleisch und Fleisch-Erzeugnissen“ angegeben. Zum Test höchstens 1,000 ml Probelösung einsetzen.

Im Test lediglich Leerwert „Ammoniak“ und „Ammoniak-Probe“ messen.

Bestimmung von Harnstoff und Ammoniak in Fleisch und Fleisch-Erzeugnissen

Etwa 5 g homogenisierte Probe (aus einer Probemenge von ca. 100 g im Mischer zerkleinert und gleichmässig gemischt) in einen Homogenisierungsbecher einwiegen, ca. 20 ml Perchlorsäure (1 M) hinzufügen und ca. 2 min homogenisieren. Inhalt mit ca. 40 ml Wasser quantitativ in ein Becherglas spülen. Unter Rühren (Magnetrührer) zuerst mit Kalilauge (5 M) grob, dann mit Kalilauge (1 M) auf den pH-Wert 7,0 (< 7,5) fein einstellen. Anschliessend den Inhalt mit Wasser 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.

Zur Abscheidung des Fettes und zur Ausfällung des Kaliumperchlorat-Niederschlags 20 min in den Kühlschrank stellen. Anschliessend filtrieren. Die ersten ml verwerfen. Klare, ggf. leicht trübe Lösung, ggf. nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle, zum Test einsetzen.

Gehaltsberechnung von Harnstoff und Ammoniak nach der allgemeinen Berechnungsformel, wobei noch jeweils mit dem Volumen-Verdrängungsfaktor K = 0,98 zu multiplizieren ist.

12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch anwendbar bei der Untersuchung von Düngemitteln, Pharmaka, Kosmetika, Papier (s. Lit. 2.1) und in der Forschung bei der Analytik biologischer Proben. Zu Probenahme, Behandlung und Stabilität der Probe siehe Lit. 1.1-1.4.

Beispiele:

12.1 Bestimmung von Harnstoff und Ammoniak in Düngemitteln

Etwa 10 g Probe zerkleinern und gründlich mischen. Ca. 100 mg des homogenen Materials in ein 100 ml - Becherglas genau einwiegen und mit 50 bis 60 ml Wasser versetzen. Mit verdünnter Salzsäure (1 M) oder - bei sauren Düngemitteln - mit verdünnter Natronlauge (1 M) pH-Wert von 7-8 einstellen. Auf einem beheizbaren Magnetprüfer etwa 10 min auf 60-70°C erwärmen. Abkühlen, quantitativ in einen 100 ml - Messkolben überführen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Lösung mischen und ggf. filtrieren. Zum Test 0,100 ml der klaren Lösung - ggf. vorher verdünnen - einsetzen.

12.2 Bestimmung von Stickstoff nach Kjeldahl-Aufschluss

Die Bestimmung von Gesamt-Stickstoff kann über die Ammoniak-Bestimmung in einer nach der Kjeldahl-Methode mineralisierten Probe erfolgen. Hierzu sind in üblicher Weise die Proben nass zu veraschen (Schwefelsäure) und der hierbei aus Stickstoff gebildete Ammoniumanteil nach vorliegender Vorschrift zu bestimmen.

Ca. 2 g der zerkleinerten und homogenisierten Probe in einen 100 ml-Kjeldahl-Kolben genau einwiegen, 20 ml Schwefelsäure (D = 1,84g/ml) und etwa 30 mg Katalysator-Gemisch (z. B. nach Wieninger) oder eine Kjeldahl-Tablette hinzufügen, ca. 2-3 Stunden erhitzen, bis die Probe aufgeschlossen ist (gelbliche oder blau-grüne Lösung). Probe abkühlen lassen und vorsichtig (Schutzbrille) quantitativ in ein mit ca. 600 ml eisgekühltem Wasser gefülltes Becherglas überführen. Hierbei ständig rühren (Magnetprüfer, Eisbad). Mit etwa 60 ml Kalilauge (10 M) neutralisieren (pH 6-8). Die neutralisierte Lösung quantitativ in einen 1 l - Messkolben überführen, mit Wasser bis zur Marke auffüllen und mischen. Die Mischung ggf. filtrieren (manchmal erforderlich nach Aufschluss mit Kjeldahl-Tabletten); die ersten ml verwerfen. Lösung ggf. verdünnen und zum Test einsetzen.

Berechnung:

Stickstoffgehalt der Probe (in %) =

$$\frac{\Delta E \times v \times MG \times 100}{\varepsilon \times d \times v \times 1000 \times \text{Einwaage [g]}} = \frac{\Delta E \times 3,040 \times 14,01 \times 100}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000 \times \text{Einwaage [g]}}$$

12.3 Bestimmung von Harnstoff und Ammoniak 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 Enteissung mit Perchlorsäure erfolgen. Siehe die oben beschriebenen Anwendungsbeispiele.)

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

Literatur

- 1.1 Gutmann, I. & Bergmeyer, H. U. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U. Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1842-1845, Verlag Chemie, Weinheim und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U. ed.) 2nd ed., vol. 4, pp. 1794-1798, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
- 1.2 da Fonseca-Wollheim, F., Bergmeyer, H. U. & Gutmann, I., (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U. Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1850-1853, Verlag Chemie, Weinheim und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U. ed.) 2nd ed., vol. 4, pp. 1802-1806, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
- 1.3 Kerschler, L. & Ziegenhorn, J. (1985) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VIII, pp. 444-453, Verlag Chemie Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- 1.4 Bergmeyer, H. U. & Beutler, H.-O. (1985) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VIII, pp. 454-461, Verlag Chemie Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- 2.1 Untersuchung von Papieren, Kartons und Pappen für die Lebensmittelverpackungen (gem. Empfehlungen XXXVI der Kunststoffkommission des Bundesgesundheitsamtes) Kapitel 8 (Methoden) Pkt. 3.4.2 (Ammoniak) und Pkt. 3.5.2. Harnstoff); März 1979
- 2.2 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau **77**, 9 (Harnstoff)
- 2.3 Brautechnische Analysenmethoden, Band III, S. 597-599 (1982), Bestimmung von Ammoniak, Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising
- 2.4 Nederlandse Norm NEN 6494 (Juni 1984) Water: Enzymatische bepaling van het gehalte aan ureum in zweemwater, (Water-Enzymatic determination of urea in swimming water)
- 3.1 Höpner, Th. (1977) Enzymatische Methoden in der Wasseranalytik - Möglichkeiten und Grenzen, Vom Wasser **49**, 173-182
- 3.2 Gerhardt, U. & Quang, T. D. (1979) Methoden zur Ammoniakbestimmung in Fleisch und Fleischerzeugnissen, Fleischwirtschaft **59**, 946-948
- 3.3 Erbersdobler, H. & Zucker, H. (1980) Harnstoff-Gehalt der Milch - ein Indikator der Proteinversorgung von Milchkühen, Kraftfutter **63**, 10-12
- 3.4 Wolfschoon-Pombo, A., Klostermeyer, H., Buchberger, J. & Graml, R. (1981) Harnstoff in der NPN-Fraktion der Kuhmilch - Bestimmung, Vorkommen und Beeinflussung, Milchwissenschaft **36**, 462-466
- 3.5 Barchietto, G., Cantoni, C., Frigerio, R. & Provera, D. (1984) Esame comparativo deiprodotti di autolisi nella carne di maiale (Azoto non proteico, Urea, Ammoniac), Conservazione degli Alimenti **3**, 12-17
- 3.6 Cheuk, W.L. & Finne, G. (1984) Enzymatic Determination of Urea and Ammonia in Refrigerated Seafood Products, J. Agric. Food Chem. **32**, 14-18.
- 3.7 Kohler, P. (1985) Ringversuch für die enzymatische Bestimmung von Harnstoff in Badewasser, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **76**, 470-477
- 3.8 Pasquier, J.-M. & Grandjean, L. (1985) Méthode de dosage de l'urée dans l'eau de piscine, Trav. chim. aliment. hyg. **76**, 464-469
- 3.9 Buchberger, J., Weiss, G. & Graml, R. (1988) Untersuchungen zum Orotsäure- und Harnstoffgehalt der Milch; I. Teil: Orotsäuregehalt, dmz deutsche molkerei-zeitung, **37** 1128-1133; II. Teil: Harnstoffgehalt, dmz deutsche molkerei-zeitung **38**, 1167-1169
- 3.10 Bartels, U. (1991) Die enzymatische Bestimmung von Ammonium im Niederschlagswasser, CLB Chemie in Labor und Biotechnik **42**, 377-382.

Harnstoff-Testkontroll-Lösung

Die Testkontroll-Lösung dient zur Kontrolle für die enzymatische Bestimmung von Harnstoff in Lebensmitteln und anderen Probematerialien.

Reagenzien

Harnstoff, p.A.

Herstellung der Testkontroll-Lösung

140 mg Harnstoff auf 0,1 mg genau einwiegen und im Messkolben mit bidest. Wasser auf 1000 ml auffüllen und gründlich mischen.

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

Anwendung:

1. Zusatz der 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. 20 min) wird die Extinktion E_3 gemessen. Aus der Differenz ($E_2 - E_3$) 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
Reaktionsgemisch 2	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Probelösung	-	0,100 ml	-	0,050 ml
Testkontroll-Lösung	-	-	0,100 ml	0,050 ml
Lösung 3	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	1,900 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:

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



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

