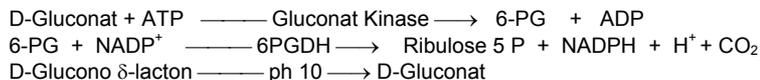


UV-Methode für ca. 32 Ansätze

 Nur für den Laborgebrauch  
Lagern zwischen +2 und +8°C

Die Methode ist im deutschen und schweizerischen Lebensmittelrecht enthalten. Empfohlen z.B. von ALVA. Standardisiert von DIN, ISO, GOST.

### Prinzip



Ref.: Möllering, H. &amp; Bergmeyer, H.U. (1967) Enzymatische Bestimmung von D-Gluconsäure in Lebensmitteln, Z.Lebensm.Unters.Forsch. 135, 198 204

### Durchführung der Bestimmung

Wellenlänge: 340 nm (NADPH)  
 $\epsilon = 6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$   
 Schichtdicke: 1,00 cm (Glas- oder Plastikkuvette)  
 Temperatur: +20 bis +25 °C  
 Testvolumen: 3,040 ml  
 Messung : gegen Luft oder Wasser  
 Probelösung: 1 bis 120 µg D-Gluconsäure / D-Glucono-δ-lacton in 0,100 bis 2,000 ml Probelösung

### Reagenzien

- # 1: Pulvermischung mit Triethanolamin-Puffer, pH ca. 7,6, ca. 80 mg NADP, ca. 190 mg ATP, Magnesiumsulfat (Stabilität, siehe Packungsetikett). *Inhalt der Flasche # 1 mit 31 ml bidest. Wasser lösen.* Die Lösung ist 1 Monat bei +2 bis +8°C, bzw. 2 Monate bei -15 bis -25 °C stabil.
- # 2: Ca. 0,7 ml Suspension 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6PGDH) (ca. 160 U) in Ammoniumsulfat (Stabilität s. Packungsetikett). *Die Suspension ist gebrauchsfertig.* Flasche vorsichtig schwenken bevor die Suspension pipettiert wird.
- # 3: Ca. 0,7 ml Suspension Gluconat-Kinase (ca. 18 U) in Ammoniumsulfat (Stabilität siehe Packungsetikett). *Die Suspension ist gebrauchsfertig.* Flasche vorsichtig schwenken bevor die Suspension pipettiert wird.

Zusätzlich wird benötigt (nicht im Kit enthalten):

Standard-Lösung Natrium- oder Kalium-D-Gluconat, 0,6 g D-Gluconsäure/l zur Testkontrolle.

Die Reagenzien zur Bestimmung von D-Gluconsäure / D-Glucono-δ-lacton sind nicht gefährlich. Die allgemeinen Regeln beim Arbeiten in chemischen Laboratorien sollten jedoch eingehalten werden. Nach Gebrauch können die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgt werden. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

### Bestimmungsansatz

In Küvetten pipettieren:	Leerwert	Standard <sup>1</sup>	Probe <sup>2</sup>	Ansatz Duplikat Probe <sup>3</sup>	Ansatz mit internem Standard <sup>4</sup>	Ansatz für Spurenanalytik <sup>5</sup>
Tea-Puffer, NADP, ATP-Lösung # 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
<b>Probelösung<sup>6</sup> (z.B. 0,06 bis 0,6 g D-Gluconsäure/l)</b>	-	-	<b>0,100 ml</b>	<b>0,200 ml</b>	<b>0,100 ml</b>	<b>2,000 ml</b>
Standardlösung <sup>6</sup> (z.B. 0,6 g D-Gluconsäure/l)	-	0,100 ml	-	-	0,100 ml	-
6-PGDH Suspension # 2	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	1,800 ml	1,800 ml	-
<b>Mischen<sup>7</sup>, nach ca. 5 min Extinktionen (E<sub>1</sub>) messen. Zugeben:</b>						
Gluconat Kinase Suspension # 3	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
<b>Mischen<sup>7</sup>, nach ca. 20 min Extinktionen (E<sub>2</sub>) messen. Extinktionsmessungen nach weiteren 2 min wiederholen<sup>8</sup>.</b>						

### Hinweise

- Das Mitführen eines "Standards" dient ausschließlich zur Erkennung von Unregelmäßigkeiten in der Analyse. Die Messung des Standards wird nicht benötigt zur Berechnung von Ergebnissen.
- Dieser Ansatz zusammen mit dem Leerwert ist eine „Einzelbestimmung“.
- Im Fall einer „Doppelbestimmung“ werden 2 Ansätze mit verschiedenen Probevolumina ausgeführt. Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein. Ergebnisse mit den entsprechenden Probevolumina  $v$  berechnen.
- Wiederfindung =  $[(\Delta E_{\text{Probe+Standard}} - \Delta E_{\text{Probe}}) / \Delta E_{\text{Standard}}] \times 100 [\%]$ .
- In der Spurenanalytik wird empfohlen, das Probevolumen bis zu 2,000 ml (0,0005 bis 0,06 g D-Gluconsäure/l) zu erhöhen.
- Vor der Dosierung Enzympipetten, bzw. Spitzen der Kolbenhubpipetten mit Probe- bzw. Standardlösung mehrfach vorspülen.
- z.B. mit einem Plastikspatel, oder durch Umschwenken nach Verschließen der Küvette mit Parafilm® (American Can Co., Greenwich Ct., USA).
- Die Reaktion ist beendet wenn die gemessene Extinktion konstant ist. Ist dies nicht der Fall, weiter in Abständen von 2 min messen, bis die Extinktionszunahme konstant ist. Extinktionen auf die Zeit der Zugabe von Gluconat Kinase (Suspension #3) extrapolieren.

## Berechnung

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

$$c = (V \times MW \times \Delta E) / (\epsilon \times d \times v \times 1000)$$

$$c = (3,040 \times 196,1 \times \Delta E) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,9463 \times \Delta E \text{ [g D-Gluconsäure/l Probelösung]}}$$

$$c = (3,040 \times 178,1 \times \Delta E) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,8594 \times \Delta E \text{ [g D-Glucono-δ-lacton/l Probelösung]}}$$

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

Bei der Analyse von Proben, die für die Analyse eingewogen werden, wird das Ergebnis auf die Einwaage bezogen:

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

## Vorbereitung der Proben

1. *Klare, farblose, annähernd neutrale flüssige Proben* ggf. verdünnen, um eine Probelösung mit 0,06 bis 0,6 g D-Gluconsäure/l zu erhalten.
2. *Trübe Lösungen* filtrieren oder zentrifugieren, ggf. verdünnen (siehe Punkt 1).
3. *Kohlensäurehaltige Proben*, z.B. durch Filtration entgasen oder NaHCO<sub>3</sub> zugeben bis die Lösung schwach alkalisch ist. Ggf. verdünnen (siehe Punkt 1).
4. *Saure (insbesondere leicht gefärbte) Lösungen* mit KOH oder NaOH auf pH 8 einstellen, einige Minuten inkubieren oder im Fall von farblosen Proben ohne pH-Einstellung verdünnen (siehe Punkt 1).
5. *„Stark gefärbte Lösungen“ auf pH 8 einstellen und gegen Probenleerwert (auf Null stellen) messen.*
6. *Feste Proben* zerkleinern (Korngröße < 0,3 mm), bzw. *halbfeste (pastöse) Proben* homogenisieren, mit Wasser extrahieren, oder in Wasser lösen, filtrieren und ggf. verdünnen (siehe Punkt 1).
7. *Fetthaltige Proben* mit heißem Wasser (Temperatur über dem Schmelzpunkt des Fettes) z.B. in einem 100 ml-Messkolben extrahieren. Auf +20 °C bringen, Messkolben bis zur Marke füllen. 15 min in Eis, bzw. 30 min in Kühlschrank stellen, filtrieren. Alternativ mit Carrez-Reagenzien klären (wird empfohlen).
8. *D-Glucono-δ-lacton* mit KOH (2 M) bei pH 10 bis 11 *hydrolysieren* (5 bis 10 min bei +20 bis +25 °C).
9. *Proben mit Perchlorsäure deproteinieren:*
  - a [g] Probe (Wassergehalt w in g/100 g) mit b [ml] Perchlorsäure (1 M), homogenisieren, filtrieren. c [ml] Filtrat mit [d] ml KOH (5 M) neutralisieren. 15 min bei +4 °C aufbewahren (Eisbad, oder 30 min im Kühlschrank), filtrieren.
  - a [g] Probe mit b [ml] Perchlorsäure (1 M) homogenisieren. Mit KOH (5 M) neutralisieren. In einen 100 ml-Messkolben überführen, mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen. (Fettschicht ist über der Marke.) 15 min bei +4 °C aufbewahren (s. o.), filtrieren.
  - a [g] Probe (Wassergehalt w in g/100 g) mit b [ml] Perchlorsäure (1 M) homogenisieren. Mit d [ml] KOH (5 M) neutralisieren. 15 min bei +4 °C aufbewahren (s. o.), filtrieren.

## Eigenschaften des Tests

1. *Spezifität* Spezifisch für D-Gluconsäure (D-Glucono-δ-lacton reagiert unter Testbedingungen in 50 min). Bei der Analyse von handelsüblichen D-Gluconsäuresalzen sind Ergebnisse von > 100 % zu erwarten, wenn die Salze freie Säure enthalten und die Ergebnisse mit dem Molgewicht der Salze berechnet werden.
2. *Empfindlichkeit:* 0,25 mg/l (ΔE = 0,005; v = 2,000 ml; V = 3,040 ml)
3. *Nachweisgrenze:* 0,5 mg/l (ΔE = 0,010; v = 2,000 ml; V = 3,040 ml)
4. *Linearität:* 1 µg/Ansatz (v = 2,000 ml; V = 3,040 ml)  
bis 120 µg/Ansatz (v = 0,100 ml; V = 3,040 ml)
5. *Präzision:* ΔE = +/- 0,005 bis 0,010 Extinktionseinheiten  
VK = ca. 1 bis 2 %
 

Fleischwurst:	r = 0,12 g/100 g	s <sub>(r)</sub> = +/- 0,004 g/100 g
	R = 0,014 g/100 g	s <sub>(R)</sub> = +/- 0,005 g/100 g
Milch:	x = 0,362 g/100 g,	r = 0,02 g/100 g, R = 0,08 g/100 g
Fettkäse:	x = 2,57 g/100 g,	r = 0,15 g/100 g, R = 0,26 g/100 g