

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

Nur für den Laborgebrauch  
Lagerung bei 2 – 8 °C

Dieser Test wurde mit ausgewählten Proben der folgenden Matrices geprüft: Milchproben, Molke und Magermilchpulver, Säuglingsnahrung, Käse, Joghurt, Eiscreme, Schokolade, Wurst und Produkte auf Sojabasis.

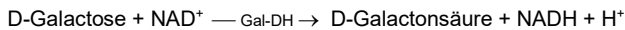
Detaillierte Ergebnisse und weitere Informationen zu den entsprechenden Validierungsdaten sind dem Validierungsbericht zu entnehmen.

Dieser Test Enzytec™ Liquid D-Galactose E8120 wurde in Verbindung mit Enzytec™ Liquid Lactose/D-Galactose E8115 als *Official Method of Analysis* 2024.10 zugelassen. Eine Publikation ist im J. AOAC Int. 108(6), 901–925 (2025) verfügbar.

Der Test kann auch mit anderen Lebensmitteln oder Probenmaterialien verwendet werden, sofern diese einer individuellen Validierung durch den Anwender unterzogen werden.

## 1. Testprinzip

D-Galactose wird in Gegenwart von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) und dem Enzym Galactose-Dehydrogenase (Gal-DH) zu D-Galactonsäure oxidiert.



NAD wird dabei zu NADH reduziert. Die gebildete Menge an NADH ist stöchiometrisch zur gebildeten Menge (freier) D-Galactose in der Probe und wird bei einer Wellenlänge von 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 und Gal-DH

### 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 zur aufgedruckten Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren.

### 2.4. Sicherheit & Entsorgung

Der Test ist ausschließlich für den in der Zweckbestimmung beschriebenen Einsatz vorgesehen. Die Gebrauchsanweisung ist strikt zu befolgen.

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Chemikalien sind anzuwenden. Das Produkt darf nicht verschluckt werden. Berührung mit Haut und Schleimhäuten ist zu vermeiden.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten sind den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu entnehmen.

Nach Gebrauch sind die Reagenzien gemäß den geltenden Vorschriften als Laborabfall zu entsorgen. Das Verpackungsmaterial ist dem Recycling zuzuführen.

## 3. Probenvorbereitung

- Die Probenvorbereitung für die manuelle und die automatisierte Testdurchführung ist identisch.
- Probenlösungen vor der Messung auf Raumtemperatur bringen.
- Flüssige, klare, farblose und annähernd neutrale Probenlösungen direkt im Test einsetzen oder ausreichend verdünnen, um eine D-Galactose-Konzentration innerhalb des angegebenen Messbereichs zu erzielen (siehe Leistungsdaten).
- Bei höheren Probenvolumina (bis zu 1000 µl) den pH-Wert der Testlösung überprüfen und im Zweifelsfall neutralisieren.
- Bei trüben Proben: die Testlösung durch einen geriffelten Papier- oder Spritzenfilter filtrieren oder in einem Reaktionsröhrchen zentrifugieren (empfohlen werden 3000 U/min für mindestens 5 Minuten), bis ein klares Filtrat / ein klarer Überstand entsteht.
- Kohlendioxidhaltige Proben mittels kurzen Ultraschallimpulses (10 s) entgasen; filtrieren, wenn die Lösung nicht klar ist.
- Stark saure Proben durch Zugabe von KOH/NaOH oder alkalische Proben durch Zugabe von HCl auf etwa pH 7 neutralisieren.
- Stark gefärbte Proben mit Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) durch Zugabe von beispielsweise 0,1 g PVPP zu 10 ml Probe entfärben. Die Proben 1 Minute lang rühren oder schütteln, dann filtrieren oder mindestens 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugieren, bis ein klarer Überstand entsteht.
- Feste und halbfeste Proben zerkleinern und homogenisieren. Eine ausreichende Probenmenge in einen Messkolben einwiegen (Messbereich beachten) und mit Wasser extrahieren. Bis zur Marke auffüllen, durch Falten- oder Spritzenfilter filtrieren oder zentrifugieren. Bei Bedarf Carrez-Klärung anwenden.
- Bei fetthaltigen Proben eine ausreichende Menge (unter Berücksichtigung des Messbereichs) in einen Messkolben einwiegen und mit heißem Wasser extrahieren. Abkühlen lassen, damit sich das Fett absetzen kann, bis zur Marke auffüllen, den Messkolben 15 Minuten lang in ein Eisbad stellen und filtrieren.
- Protein- und fetthaltige Proben mit Carrez-Reagenzien klären: Geeignete Probenmenge in einen 100 ml Messkolben genau einwiegen und ca. 60 ml destilliertes Wasser hinzufügen. Flüssige Proben in einen 100-ml-Messkolben oder ein Becherglas pipettieren, der/das zuvor mit 60 ml destilliertem Wasser gefüllt wurde. 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g Kalium-hexacyanoferrat(II)-Trihydrat  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3 \text{H}_2\text{O}/100 \text{ ml}$ ) und 5 ml Carrez-II-Lösung (7,20 g Zinksulfat  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}/100 \text{ ml}$ ) zugeben. Nach jeder Zugabe gut mischen. Den pH-Wert mit 0,1 M NaOH auf einen Wert zwischen 7,5 und 8,5 einstellen. Die Lösung in einen 100-ml-Messkolben geben, bis zur Marke auffüllen, mischen und durch geriffelten Papierfiltern oder Spritzenfiltern filtrieren.

**Hinweis:** Spezifische Probenvorbereitungen für Lebensmittel wie Fleischprodukte, Backwaren, Milch und Milchprodukte sowie Käse und Schokolade finden Sie in der Durchführungsanweisung der Testkits für Enzytec™ Liquid Lactose/D-Galactose (Art.Nr. E8110) oder Enzytec™ Liquid Combi Lactose/D-Galactose (Art.Nr. E8115).

## 4. Manuelle Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm  
Temperatur: 20 – 37 °C  
Photometer-Abgleich: gegen Luft (ohne Küvette)  
Messbereich: 8 – 2000 mg/l (für 100 µl Probe)

	Reagenzleerwert	Probe / Kontrolle
<b>Reagenz 1</b>	2000 µl	2000 µl
<b>Probe / Kontrolle</b>	-	100 µl
<b>Dest. Wasser</b>	100 µl	-
Mischen, <b>3 Minuten bei 20 – 37 °C</b> inkubieren. <b>Extinktion E<sub>1</sub> messen</b> , dann Zugabe von:		
<b>Reagenz 2</b>	500 µl	500 µl
Mischen, <b>15 Minuten bei 20 – 37 °C</b> inkubieren und <b>Extinktion E<sub>2</sub> messen</b> .		

4.1. Wichtige Hinweise zur Testdurchführung

- Der Reagenzleerwert (Wasserprobe) muss bei jeder Messserie mitbestimmt und von jedem Probenergebnis abgezogen werden.
- Die angegebenen Inkubationszeiten wurden bei 25 °C validiert und festgelegt. Die Durchführung des Tests ist grundsätzlich auch im Temperaturbereich von 20 – 37 °C möglich.
- Verwenden Sie für jeden Probenextrakt und die Kontrolllösungen separate Spitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden; spülen Sie die Spitze vor dem Pipettieren.
- Für die Zugabe der Reagenzien wird die Verwendung einer Multistep-Pipette empfohlen. Verwenden Sie für jede Komponente eine separate Spitze.
- Zur Durchmischung empfiehlt sich die Verwendung von Rührspateln für jede einzelne Küvette. Diese erst unmittelbar vor den Extinktionsmessungen aus der Küvette nehmen.
- Das Ende der Reaktion bzw. ein Stillstand der Extinktionen sollte (zumindest bei den ersten Testdurchläufen bzw. der Validierung) stets abgewartet werden. Ist die Extinktion nach der empfohlenen Inkubationszeit nicht zum Stillstand gekommen, sollte weiter in bspw. 5-min-Abständen gemessen werden, bis ein konstanter Extinktionswert erreicht ist.
- Sollte eine Schleichreaktion auftreten, ist die Reaktion nach den angegebenen Inkubationszeiten noch nicht abgeschlossen und zeigt in der Regel einen konstanten Anstieg von ΔE. Berechnen Sie den analyt-spezifischen ΔE-Wert, indem Sie die Absorptionswerte gegen die Zeit auftragen und eine lineare Regression durchführen, um die Anstiegsrate von ΔE pro Minute in Relation zur Schleichreaktion zu bestimmen. Extrapolieren Sie dann die Absorption auf den Zeitpunkt der Reagenz-2-Zugabe.
- Ist die gemessene Extinktionsdifferenz der Proben zu klein (< 0,020), so ist die Probelösung mit höherer Einwaage oder weniger starker Verdünnung erneut herzustellen.
- Ist die Extinktionsdifferenz der Proben sehr groß (bspw. > 1,500), so ist die Probelösung gegebenenfalls zu verdünnen.

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung der D-Galactose-Konzentration

Es gilt die Extinktionsdifferenz ΔE für jede Probe zu berechnen:

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünungsfaktor)  
RLW: Reagenzleerwert

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

Der angegebene df-Wert von 0,808 gilt für eine Basisapplikation von 100 µl. Eine Erhöhung des Probenvolumens ist möglich (max. 1000 µl; siehe Validierungsbericht). Bei gleichbleibenden Reagenzvolumina erfordert dies die Umrechnung des Reagenzverdünungsfaktors (df).

Bei Erhöhung des Probenvolumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es, dies matrix-abhängig zu überprüfen. Der Reagenzleerwert ist dem veränderten Probenvolumen anzupassen.

Die Berechnung der D-Galactose-Konzentration erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$C_{\text{D-Galactose}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(\epsilon \times d \times v \times 1000)} = 0,744 \times \Delta E \times F$$

Wurde der Probenextrakt vor der Messung verdünnt, muss dieses Ergebnis mit dem Vorverdünungsfaktor F multipliziert werden.

V:	Testvolumen Basisapplikation [ml]	= 2,600
MG:	Molekulargewicht D-Galactose [g/mol]	= 180,16
d:	Schichtdicke [cm]	= 1,00
v:	Probenvolumen [ml]	= 0,100
ε:	Extinktionskoeffizient NADH [l/mmol × cm]	= 6,3 (bei 340 nm)

5.2. Berechnung des D-Galactose-Gehalts in Feststoffen

Bei der Analyse fester und halbfester Proben, die für die Extraktion der Probe eingewogen werden müssen, wird der Gehalt auf die Einwaage bezogen:

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir den Enzytec™ Liquid Multi-Sugar Standard low (Art. Nr. E8440; 0,50 g/l D-Galactose).

Die Wiederfindung des Multi-Standards low sowie anderen wässrigen Kontrolllösungen sollte bei 100 ± 5 % liegen.

Zur Herstellung von Kontroll- oder Standardlösungen empfiehlt sich beispielsweise die Verwendung des folgenden Materials:

- D-Galactose ≥ 99 %, wasserfrei (Carl Roth, Art.Nr. 8878.2); c = 1 g/l Galactose in destilliertem Wasser; ca. eine Woche bei 4 – 8 °C haltbar.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Der Test ist spezifisch für D-Galactose. Das Galactose-System zeigt jedoch eine Nebenaktivität gegenüber L-Arabinose, wobei L-Arabinose durch die Galactose-Dehydrogenase zu etwa 120 % oxidiert wird.

Auch 6-O-(β-D-Galactopyranosyl)-D-Galactopyranose zeigte eine Nebenaktivität mit einer Wiederfindung von etwa 50 %.

6.2. Interferenzen

Die folgenden Substanzen wurden in einem Multi-Zuckerstandard in Konzentrationen von 1 g/l bis 58 g/l untersucht: Ascorbinsäure, SO<sub>2</sub>, D-/L-Milchsäure, Essigsäure, D-/L-Weinsäure, Citronensäure, D-/L-Apfelsäure, NaCl, Taurin, Glycerin, Oxalsäure, Benzoesäure, Gluconsäure, Mucinsäure, Glucosamin, β-Lactoglobulin und Casein. Bei keiner der getesteten Substanzen wurde eine Interferenz beobachtet. Sulfit stört bei ≤ 0,5 g/l oder darunter nicht, während Ascorbinsäure bei ≤ 10 g/l oder darunter nicht stört.

Im Rahmen der Validierung auf Interferenzen wurden mehrere Zuckerersatzstoffe in einer Konzentration von 10 g/l in einem Mehrzucker-Standard (mit 0,25 g/l Galactose) getestet: Sorbit, Mannit, Isomalt, Maltit, Lactit, Xylit, Erythrit, Inulin, Isomaltulose, Fructose, Maissirup, Oligofruktose und Trehalose zeigten keine störende Wirkung bei der Bestimmung von D-Galactose.

Zahlreiche Süßstoffe wurden in Konzentrationen von 1 g/l, 2 g/l oder 5 g/l auf ihre Interferenz in Gegenwart von 0,25 g/l D-Galactose getestet: Acesulfam, Adventam, Aspartam, Cyclamat, Neohesperidin, Neotam, Saccharin, Sucralose, Thaumatin und Alitam zeigten keine störende Wirkung bei der Bestimmung von D-Galactose.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Linearität ist bis 2000 mg/l D-Galactose gegeben (100 µl Probe). Der empfohlene Messbereich beträgt 8 – 2000 mg/l.

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung ermittelt. Bei einem Probenvolumen von 100 µl beträgt die berechnete LoD 2,0 mg/l.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde mittels Präzisionsprofil ermittelt und beträgt 8,0 mg/l bei einem Probenvolumen von 100 µl.

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt ΔE = 0,005. Für ein Probenvolumen von v = 1000 µl ergibt sich eine errechnete LoD von 0,5 mg/l. Auf Basis von ΔE = 0,010 wurde eine LoQ von 1,0 mg/l errechnet.

## 7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ Liquid D-Galactose Validierungsbericht
- Enzytec™ Liquid Allgemeines Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid D-Galactose Excel-Auswertevorlage
- Enzytec™ Liquid D-Galactose Technical Information
- Enzytec™ Liquid Troubleshooting-Handbuch

Sicherheitsdatenblätter (SDS) und Analysenzertifikate (CoA) sind in digitaler Form und unter Angabe der Chargennummer über folgenden Link erhältlich:

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



## 8. Grenzen dieser Methode

Die Testergebnisse können in Abhängigkeit von der Probenmatrix, der individuellen Testdurchführung und den Umgebungsbedingungen im Labor variieren. Die Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen hängen von der jeweiligen Probenmatrix und dem Extraktionsverfahren ab. Detaillierte Informationen entnehmen Sie bitte dem aktuellen Validierungsbericht.

Für den vorliegenden Enzymtest wurden aufgrund der großen Anzahl von Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien nur angegebene, beispielhafte Matrices validiert.

Bei der Analyse einer nicht-validierten Matrix wird empfohlen, die erzielten Ergebnisse durch Dotierexperimente zu überprüfen. Falls erforderlich, ist eine geeignete Probenvorbereitung für die betreffende Probenmatrix zu entwickeln und ggf. zu validieren.

Die Verantwortung für die Validierung nicht geprüfter Matrices sowie für die Sicherstellung der Eignung des Tests für den vorgesehenen Zweck liegt ausschließlich beim Anwender.

## 9. Dienstleistungen & technischer Support

Auf Anfrage bieten wir Ihnen u.a. folgende Dienstleistungen:

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

## 10. Haftungsausschluss

Diese Angaben entsprechen dem aktuellen Stand unserer Kenntnisse und dienen ausschließlich der Information über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten. Sie stellen keine Zusicherung bestimmter Eigenschaften oder deren Eignung für einen konkreten Verwendungszweck dar.

R-Biopharm AG leistet für Sach- und Rechtsmängel über einen Zeitraum von 12 Monaten (bzw. im Falle von Produkten, die eine kürzere Haltbarkeit haben, bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums oder bei limitierter Verwendung bis zum Erreichen der Anzahl der Verwendungen) Gewähr, gerechnet vom Tag des Gefahrübergangs, vorbehaltlich einer frist- und formgerechten Rüge durch den Kunden, wobei die vereinbarte Beschaffenheit und Eignung für die vertraglich vorausgesetzte Verwendung und Übergabe mit vereinbartem Zubehör und vereinbarten Anleitungen („subjektiven Anforderungen“) entscheiden, ob eine Sache mangelhaft ist.

Die R-Biopharm AG übernimmt keine Gewährleistung für Folgen aus der Versäumnis

- a. Die Gebrauchs- oder Sicherheitsanweisungen eines Produktes zu lesen, zu verstehen oder zu befolgen;
- b. geschultes und qualifiziertes Personal für das Produkt einzusetzen;
- c. geeignete Industriestandards- und Praktiken anzuwenden, insbesondere Good Laboratory Practices;
- d. für das Produkt geeignete Kontroll-/Proben-/Probenmatrices oder Abarbeitungsverfahren/Prozesse einzusetzen und dies, soweit erforderlich, zu überprüfen;
- e. sonstige fehlerhafte Benutzung;
- f. Veränderung oder Bearbeitungen der Produkte
- g. unsachgemäße Lagerung durch den Kunden oder Dritte
- h. Folgen chemischer, elektromagnetischer, mechanischer oder elektrolytischer Einflüsse außerhalb der von R-Biopharm AG dokumentierten Standardbereiche
- i. Schäden und Störungen, die durch von R-Biopharm nicht zu vertretende äußere Einwirkungen entstanden sind (z.B. Einbruch, Diebstahl, Blitzschlag, Feuer, Wasser, höhere Gewalt).

R-Biopharm AG haftet für Arglist, grobe Fahrlässigkeit oder Vorsatz der R-Biopharm AG, Verletzung von Leib, Leben oder Gesundheit, der Übernahme einer Garantie, eines Beschaffungsrisikos nach § 276 BGB oder einer Haftung nach einem anderen gesetzlich zwingenden Haftungstatbestand.

Die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung wesentlicher Vertragspflichten (Pflichten, die für die Erreichung des Vertragszwecks wesentlich sind und auf deren Einhaltung der Vertragspartner regelmäßig vertrauen darf) ist auf den vertragstypisch vorhersehbaren Schaden begrenzt; die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung anderer Pflichtverletzungen ist ausgeschlossen.

ALLE WEITEREN AUSDRÜCKLICHEN ODER STILLSCHWEIGENDEN GEWÄHRLEISTUNGEN ODER GARANTIEEN JEDLICHER ART SIND AUSGESCHLOSSEN, UNABHÄNGIG DAVON, OB SIE SICH AUS GEPFLOGENHEITEN, GESCHÄFTSPRAKTIKEN, DEM GESCHÄFTSVERLAUF ZWISCHEN DEN PARTEIEN ODER ANDEREN UMSTÄNDEN ERGEBEN.

Die R-Biopharm AG übernimmt keine Haftung für Folgeschäden, insbesondere entgangenen Gewinn, Produktionsrückstände oder sonstige mittelbare Schäden.