

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

Nur für den Laborgebrauch  
Lagerung bei 2 - 8 °C

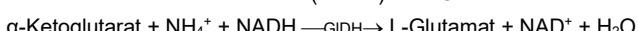
Dieser Test wurde mit ausgewählten Proben der folgenden Matrices geprüft: Milch, Fruchtsäfte, Wein, Käse sowie Wurstwaren und Fleischprodukte.

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

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

## 1. Testprinzip

Ammoniak / Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) reagiert mit  $\alpha$ -Ketoglutarat in Gegenwart von Glutamatdehydrogenase (GIDH) und reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) zu L-Glutamat und NAD $^+$ :



Die verbrauchte Menge an NADH ist der umgesetzten Menge an Ammoniak äquivalent 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, NADH
- Reagenz 2: 2 x 12,5 ml mit Puffer,  $\alpha$ -Ketoglutarat, GIDH

### 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.
- Proben vor der Messung auf Raumtemperatur bringen.
- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen mit dest. Wasser auf eine Konzentration innerhalb des Messbereichs (siehe Leistungsdaten) im Test einsetzen.
- Stark saure oder stark alkalische Proben sind mit KOH oder HCl auf einen pH-Wert von 6 - 8 zu neutralisieren.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.

- Feste und halbfeste Proben zerkleinern und homogenisieren und mit Wasser extrahieren (z.B. 30 min bei 60 °C). Filtern, zentrifugieren oder bei Bedarf Perchlorsäure-Klärung anwenden.
- 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.
- Wichtig:** eine Carrez-Klärung darf mit diesem Test aufgrund der Absorption von Ammoniak **nicht** durchgeführt werden, proteinhaltige Proben müssen mit Perchlorsäure geklärt werden.

### 3.1. Milch

- 4 ml Trichloressigsäure (0,3 M) zu 1 ml Milch in ein Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss geben.
- Mischen und 5 Minuten inkubieren, bevor die Lösung bei 4000 U/min für 3 Minuten zentrifugiert wird.
- Den Überstand nach der Zentrifugation dekanter und mit KOH (5 M) neutralisieren, auf ein bekanntes Volumen bringen, z.B. durch Überführen in einen Messkolben, filtrieren und mindestens 500 µl des klaren Überstands für die Messung verwenden; dieser Extrakt kann auch zur Bestimmung von Harnstoff verwendet werden.

### 3.2. Käse, Wurst- und Fleischproben

- Feste Proben wie Käse oder Fleisch homogenisieren und 5 g davon in einem Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss abwiegen.
- 20 ml 1 M Perchlorsäure hinzufügen und 2 Minuten lang mischen, bis die Probe gleichmäßig suspendiert ist.
- Den Inhalt des Bechers quantitativ mit zusätzlichem Wasser in einen 100-ml-Messkolben überführen und mit Wasser auf 100 ml auffüllen, sodass sich die wässrige Phase an der Kalibrierungsstelle befindet (die Fettschicht befindet sich oberhalb der Kalibrierungsstelle).
- Den Kolben für 20 Minuten bei 2 - 8 °C im Kühlschrank lagern, um Fett und Perchlorat auszufällen.
- Die Lösung filtern und sauberen Überstand im Assay einsetzen (ggf. ist eine Verdünnung erforderlich).

## 4. Testdurchführung

Wellenlänge:	340 nm
Temperatur:	20 - 37 °C (während der Messung)
Photometer-Abgleich:	gegen Luft (ohne Küvette)
Messbereich:	4 - 80 mg/l

	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 min bei 20 - 37 °C</b> inkubieren. Extinktion $E_1$ messen, dann Zugabe von:		
<b>Reagenz 2</b>	500 µl	500 µl
Mischen, <b>20 min bei 20 - 37 °C</b> inkubieren und Extinktion $E_2$ messen.		

### 4.1. Hinweise zur Testdurchführung

- Der Reagenzleerwert (Wasserprobe) muss bei jedem Lauf einmalig bestimmt und von jedem Probenergebnis abgezogen werden.
- Die angegebenen Inkubationszeiten wurden bei 25 °C verifiziert und festgelegt. Die Durchführung des Tests ist grundsätzlich auch im Temperaturbereich von 20 °C bis 37 °C möglich.
- Aufgrund der Flüchtigkeit von Ammoniak wird empfohlen, erst die Menge an Reagenz 1 vorzulegen und anschließend die Probenmenge zu pipettieren.

- Verwenden Sie für jeden Probenextrakt und die Kontrolllösungen separate Spitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden; spülen Sie die Spitze vor dem Pipettieren.
- Für die Zugabe von Reagenz 1 und 2 wird die Verwendung einer Multistep-Pipette empfohlen. Verwenden Sie für jede Komponente eine separate Spalte.
- 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.
- Die gemessenen Extinktionsdifferenzen ( $\Delta E$ ) sollten zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Extinktionseinheiten betragen.
- 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 bei Probelösungen

#### 5.1.1. Gesamtkonzentration Ammoniak

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)  
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 Reagenzverdünnungsfaktors (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.

$$C_{\text{Ammoniak}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(E \times d \times v \times 1000)} = 0,0703 \times \Delta E \times F$$

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

V:	Testvolumen Basisapplikation [ml]	= 2,600
MG:	Molekulargewicht [g/mol]	= 17,03
d:	Schichtdicke [cm]	= 1,00
v:	Probenvolumen [ml]	= 0,100
e:	Extinktionskoeffizient NADH [l/mmol x cm]	= 6,3 (bei 340 nm)

### 5.2. Berechnung bei Feststoffen

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

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

### 5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Die Wiederfindung von wässrigen Kontrolllösungen sollte innerhalb  $100 \pm 5\%$  liegen. Wir empfehlen dazu die Verwendung von zertifizierten Referenzmaterialien oder Standardlösungen, wie zum Beispiel:

- LGC reference standard: Ammonia ion in H<sub>2</sub>O; c = 10 mg/L of NH<sub>3</sub>; article: #VHG-INH3-10-100
- LGC reference standard: Ammonia ion in H<sub>2</sub>O; c = 100 mg/L of NH<sub>3</sub>; article: #VHG-INH3-100-100

Zur Herstellung einer Kontroll- oder Dotier-Lösung kann folgendes Material verwendet werden:

- Ammoniumsulfat, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, p.a., #198271027 (Carl Roth).

Eine Stammlösung mit einer Konzentration von  $c = 1 \text{ g/l}$  wird wie folgt berechnet und hergestellt:

- Molekulmasse (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 132,14 g/mol
- Molekulmasse NH<sub>3</sub> = 17,03 g/mol
- Molares Verhältnis = 1 : 7,759/2 → Faktor: 3,8795

3,8795 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, gelöst in 1 L destilliertem Wasser, entsprechen 1 g/l NH<sub>3</sub>.

Diese Stammlösung kann weiter mit destilliertem Wasser verdünnt oder zur Aufstockung flüssiger Matrices verwendet werden.

## 6. Leistungsdaten

### 6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Der Test ist spezifisch für Ammoniak. Im Rahmen der Validierung wurden verschiedene potenziell interferierende Substanzen geprüft. Für keine dieser untersuchten Substanzen, konnten Kreuzreaktionen oder andere Nebenaktivitäten identifiziert werden (siehe Validierungsbericht für detaillierte Informationen).

### 6.2. Interferenzen

Der Test wurde hinsichtlich potenzieller interferierender Substanzen untersucht und zeigt keine interferierenden Effekte in Anwesenheit von Ammoniak bei oder unter den jeweils in Klammern angegebenen Konzentrationen:

D-Glucose (150 g/l), D-Fructose (80 g/l), D-Galactose (0,5 g/l), Saccharose (0,5 g/l), Laktose (0,5 g/l), Glycerol (0,2 g/l), D-/L-Äpfelsäure (10 g/l), D-/L-Weinsäure (5 g/l), Zitronensäure (2,5 g/l), D-Gluconsäure (0,2 g/l), D- und L-Milchsäure (0,15 g/l), Essigsäure (5 g/l), Ascorbinsäure (2,5 g/l), Sulfit (2,5 g/l), Kaliumnitrat (0,25 g/l), Natriumnitrit (0,05 g/l) und Natriumchlorid (50 g/l)

### 6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Die Linearität ist bis 80 mg/l Ammoniak gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 4 und 80 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 0,08 mg/l. Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde mittels Präzisionsprofil ermittelt und beträgt 4 mg/l.

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt  $\Delta E = 0,005$ . Für ein Probenvolumen von  $v = 1000 \mu\text{l}$  ergibt sich ein errechnetes LoD von 0,04 mg/l. Auf Basis von  $\Delta E = 0,010$  wurde ein LoQ von 0,08 mg/l errechnet.

## 7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ Liquid Ammonia E8390 Validierungsbericht
- Enzytec™ Liquid Allgemeines Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid Ammonia E8390 Excel-Auswertevorlagen
- Enzytec™ Liquid Ammonia E8390 Technical Info
- Enzytec™ Liquid Troubleshooting-Handbuch

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

<https://eifur.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 folgende Leistungen:

- Kundenspezifisches Troubleshooting
- 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 STILL-SCHWEIGENDEN GEWÄHRLEISTUNGEN ODER GARANTIEN JEGLICHER ART SIND AUSGESCHLOSSEN, UNABHÄNGIG DAVON, OB SIE SICH AUS GEPRÜFTHEITEN, 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.