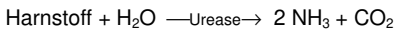


UV-Test zur Bestimmung von Harnstoff und Ammoniak in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
Test-Kombination für 50 Bestimmungen

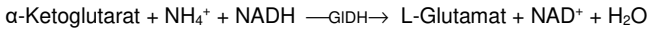
Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

1. Testprinzip

Das Enzym Urease spaltet Harnstoff zu Ammoniak und Kohlendioxid:



Gebildeter und freier Ammoniak reagiert als Ammonium (NH_4^+) mit α -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 und der halben Menge Harnstoff 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 α -Ketoglutarat, Urease, 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 zum Monatsende der angegebenen Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren.

2.4. Sicherheit & Entsorgung

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Chemikalien sind zu beachten. Nicht verschlucken sowie Berührung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten sind den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu entnehmen. Nach Gebrauch können die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgt und das Verpackungsmaterial dem Recycling zugeführt werden.

3. Probenvorbereitung

- Die Probenvorbereitung für die manuelle und die automatisierte Testdurchführung ist identisch.
- Die Proben sollten vor der Messung auf Raumtemperatur gebracht werden.
- 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 Proben sind mit Natron- oder Kalilauge auf pH 6 - 8 zu neutralisieren.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Carrez-Fällung darf mit diesem Test aufgrund der Absorption von Ammoniak **nicht** eingesetzt werden, proteinhaltige Proben müssen mit Perchlorsäure geklärt werden.
- Feste und halb feste Proben zerkleinern und homogenisieren und mit Wasser extrahieren (z. B. 30 min bei 60 °C). Filtrieren oder 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.

- Milchproben: 1 ml Milch + 4 ml Trichloressigsäure (0,3 M) mischen, nach ca. 5 min den Niederschlag zentrifugieren und klaren Überstand im Test einsetzen.
- Aufgrund der Flüchtigkeit von Ammoniak wird empfohlen, erst die Menge an Reagenz 1 vorzulegen und anschließend die Probenmenge zu pipettieren.

4. Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
Temperatur: 20 - 37 °C (während der Messung)
Messung: gegen Luft (ohne Küvette) oder Wasser
Messbereich: 8 - 170 mg/l

	Reagenzleerwert	Probe / Kontrolle
Reagenz 1	2000 µl	2000 µl
Probe / Kontrolle	-	100 µl
Dest. Wasser	100 µl	-
Mischen, 3 min bei 20 - 37 °C inkubieren. Extinktion E_1 messen, dann Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, 20 min bei 20 - 37 °C inkubieren und Extinktion E_2 messen.		

Der Reagenzleerwert muss bei jedem Lauf einmalig mitbestimmt und von jedem Probenergebnis abgezogen werden.

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probelösungen

5.1.1. Gesamtkonzentration Harnstoff

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)
RLW: Reagenzleerwert

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

Eine Erhöhung des Probenvolumens (bis max. 1000 µl) bei unveränderten Reagenzvolümina erfordert Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors (df). Bei Erhöhung des Volumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es dies Matrix-abhängig zu überprüfen.

$$C_{\text{Harnstoff}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times \text{MG} \times \Delta E)}{(\varepsilon \times 2 \times d \times v \times 1000)} = 0,1239 \times \Delta E$$

V: Testvolumen Basisapplikation [ml] = 2,600
MG: Molekulargewicht [g/mol] = 60,06
d: Schichtdicke [cm] = 1,00
v: Probevolumen [ml] = 0,100
ε: Extinktionskoeffizient NADH [l/mmol x cm] = 6,3 (bei 340 nm)

5.2. Berechnung bei Feststoffen

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

5.3. Differenzierung von Harnstoff und freiem Ammoniak

$$C_{\text{Harnstoff ohne freies Ammoniak}} [\text{g/l}] = C_{\text{Harnstoff/Ammoniak}} - (C_{\text{Ammoniak}} \times 1,763)$$

5.4. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Die Wiederfindung von wässrigen Kontrolllösungen sollte innerhalb $100 \pm 5\%$ liegen.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität

Der Test ist spezifisch für Harnstoff und Ammoniak.

6.2. Interferenzen & Nebenaktivitäten

Der Test zeigt keine Nebenaktivitäten oder Interferenzen mit relevanten organischen Säuren, Zuckern oder Konservierungsstoffen wie Ascorbinsäure. Sulfit und Citronensäure interferieren nicht bei oder unter 6,25 g/l bzw. 25 g/l.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Die Linearität ist bis 170 mg/l Harnstoff gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 8 und 170 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 4,0 mg/l.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde mittels Präzisionsprofil ermittelt und beträgt 8,0 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 0,08 mg/l. Auf Basis von $\Delta E = 0,010$ wurde ein LoQ von 0,17 mg/l errechnet.

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ Liquid Validierungsberichte
- Enzytec™ Liquid Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid Excel-Auswertevorlagen
- Enzytec™ Liquid Troubleshooting-Handbuch

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

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



8. Dienstleistungen & technischer Support

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Leistungen:

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

9. Haftungsausschluss

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.