UV-Test zur Bestimmung von D-Gluconsäure 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 validiert: Rot- und Weißwein, Fruchtsaft und fermentierte Erfrischungsgetränke.

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

Enzymatische UV-Bestimmung von D-Gluconsäure und D-Glucono-delta-lacton mit Gluconatkinase (GK), ADP-abhängiger Hexokinase (ADP-HK) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH).

D-Gluconsäure + ATP $\xrightarrow{GK}$ D-Gluconat-6-Phosphat + ADP

ADP + D-Glucose $\xrightarrow{ADP\text{-}HK}$ D-Glucose-6-Phosphat + AMP

D-Glucose-6-Phosphat + NAD^+ $\xrightarrow{G6P\text{-}DH}$ D-Glucono-delta-lacton-6-Phosphat + NADH + H^+

Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) wird dabei zu NADH reduziert. Die gebildete NADH-Menge ist proportional zur gebildeten D-Gluconsäure Menge 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, NAD
- Reagenz 2: 2 x 12,5 ml mit Puffer, ADP-HK, G6P-DH, GK

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.
- Probelösungen 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.
- 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.
- Stark gefärbte Proben mit Aktivkohle oder PVPP (z.B. 0,1 g/10 ml bis zu 0,5 g/10 ml) behandeln und anschließend filtrieren Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Zur Klärung proteinhaltiger Proben empfiehlt sich eine Aufarbeitung mit Perchlorsäure oder Trichloressigsäure.
- 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.
- Proben mit niedrigem pH-Wert mit 5 M Natriumhydroxidlösung auf einen pH-Wert von 10 - 11 einstellen.

4. Manuelle Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
Temperatur: 20 - 37 °C (während der Messung)
Messung: gegen Luft (ohne Küvette) oder Wasser
Messbereich: 6 - 1500 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, 10 min bei 20 - 37 °C inkubieren und Extinktion E_2 messen.		

4.1. Wichtige Hinweise zur Testdurchführung

- Der Reagenzleerwert (Wasserprobe) **muss bei jedem Lauf einmalig** mitbestimmt und von **jedem** Probenergebnis abgezogen werden.
- Die angegebenen Inkubationszeiten wurden **bei 37 °C** verifiziert und festgelegt. Die Durchführung des Tests ist grundsätzlich auch im Temperaturbereich von **20 °C bis 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 von Reagenz 1 und 2 wird die Verwendung einer Multistepper-Pipette empfohlen. Verwenden Sie für jede Komponente eine separate Spitze.
- Zur Durchmischung empfiehlt sich die Verwendung von Rührspateln für jede einzelne Küvette. Diesen 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. 2- oder 5-Minuten-Abständen gemessen werden, bis ein konstanter Extinktionswert erreicht ist.
- 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. Konzentration D-Gluconsäure

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

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 Reagenzvolumina erfordert Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors (df). Bei Erhöhung des Volumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es dies Matrix-abhängig zu überprüfen.

$$\mathbf{C_{D\text{-}Gluconsäure}\ [g/l]} = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(\varepsilon \times d \times v \times 1000)} = \mathbf{0{,}809 \times \Delta E}$$

V:	Testvolumen Basisapplikation [ml]	= 2,600
MG:	Molekulargewicht D-Gluconic acid [g/mol]	= 196,16
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

$$Gehalt_{D\text{-}Gluconsäure}\ [g/100\ g] = \frac{C_{D\text{-}Gluconsäure}\ [g/l\ Probelösung]}{Einwaage_{Probe}\ in\ g/l\ Probelösung} \times 100$$

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir Enzytec™ *Liquid* Multi-Acid Standard low (E8460).
Die Wiederfindung des Enzytec™ *Liquid* Multi-Acid Standard low sowie anderen wässrigen Kontrolllösungen sollten innerhalb 100 ± 5 % liegen.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität

Der Test ist spezifisch für D-Gluconsäure.

6.2. Interferenzen & Nebenaktivitäten

In Gegenwart von D-/L-Äpfelsäure sowie D-/L-Weinsäure und meso-Weinsäure wurden unter 6,25 g/l keine Interferenzen ermittelt. Sulfit zeigte bei oder unter einer Konzentration von 0,5 g/l keine Interferenzen.
Der Test zeigt keine Nebenaktivitäten mit anderen relevanten Säuren.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Die Linearität ist bis 2500 mg/l D-Gluconsäure gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 6 und 1500 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 µl ermittelt. Hieraus ergibt sich ein LoD von 1,5 mg/l. Bei einem Probenvolumen von v = 1000 µl ergibt sich ein LoD von 0,25 mg/l.
Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde mittels Präzisionsprofil ermittelt und beträgt 6 mg/l (100 µl Probenvolumen).
Auf Basis von einer Extinktionsdifferenz ΔE = 0,010 und einem Probenvolumen von 1000 µl ergibt sich ein errechneter LoQ von 1,09 mg/l.

6.4. Automatisierung mittels Pictus 500

6.4.1. Bestimmungsgrenze (LoQ)

P500 Applikation	LoQ
High Range	60 mg/l
Basic Range	12,5 mg/l
Sensitive Range	2 mg/l

6.4.2. Messbereiche

P500 Applikation	Messbereich
High Range	bis 9375 mg/l
Basic Range	bis 1875 mg/l
Sensitive Range	bis 187,5 mg/l

6.4.3. Präzision und Richtigkeit

Hier dargestellt sind Daten der Messung einer wässrigen Lösung.

High Range

Zielkonzentration, mg/l	500	1200
Mittelwert, mg/l	483	1161
SD, mg/l	5,60	6,70
RSD, %	1,16	0,58
Wiederfindung, %	96,5	96,7

Basic Range

Zielkonzentration, mg/l	500	1200
Mittelwert, mg/l	479,9	1172
SD, mg/l	2,47	3,85
RSD, %	0,51	0,33
Wiederfindung, %	96,0	97,6

Sensitive Range

Zielkonzentration, mg/l	50	120
Mittelwert, mg/l	48,9	124,7
SD, mg/l	0,26	0,43
RSD, %	0,54	0,35
Wiederfindung, %	96,0	97,6

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ *Liquid* D-Gluconic acid Validierungsberichte
- Enzytec™ *Liquid* acid Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ *Liquid* D-Gluconic acid Excel-Auswertevorlagen
- Enzytec™ *Liquid* Troubleshooting-Handbuch

Sicherheitsdatenblätter (SDS) und Analysenzertifikate (CoA) sind in digitaler Form unter folgendem Link erhältlich:
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 Matrizes 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 GARANTIEN JEGLICHER 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.