

Enzymatischer UV-Test zur Bestimmung von L-Glutaminsäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
Test-Kombination für 50 Bestimmungen

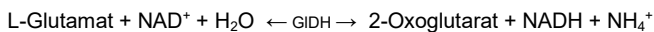
Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

Dieser Test wurde für die folgenden Matrices validiert: Gemüsebrühe und Brühwürfel, Hot Dog Sauce, Gemüsepüree, Wurst, Ketchup, Lasagne Bolognese, Tomatenpesto und Sojasauce. Detaillierte Ergebnisse und weitere Informationen zu den Validierungsdaten finden Sie im Validierungsbericht.

Andere Lebensmittel oder Probenmaterialien können getestet werden und müssen vom Anwender validiert werden.

1. Testprinzip

L-Glutaminsäure (L-Glutamat) wird durch Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) in Gegenwart des Enzyms Glutamat-Dehydrogenase (GIDH) oxidativ zu 2-Oxoglutarat desaminiert:



L-Glutamat reagiert quantitativ. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt auf der Seite des 2-Oxoglutarats. Die Menge des bei dieser Reaktion gebildeten NADH ist stöchiometrisch zur Menge der L-Glutaminsäure. NADH wird auf der Grundlage seiner spezifischen Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Das Ergebnis wird in g/l oder g/100 g L-Glutaminsäure angegeben.

2. Reagenzien

2.1. Inhalt & Zusammensetzung

Der Test ist für eine manuelle und automatisierte Abarbeitung geeignet.

Die Reagenzien reichen für 50 Bestimmungen bei manueller Abarbeitung. Die Anzahl der Bestimmungen bei automatisierter Abarbeitung ist um ein Vielfaches erhöht, jedoch geräteabhängig. Die Inkubationszeiten bei automatisierter Abarbeitung können ggf. abweichen und müssen daher verifiziert werden.

- | | | |
|-------------|-------------|--------------|
| • Reagenz 1 | 2 x 50 ml | Puffer, GIDH |
| • Reagenz 2 | 2 x 12,5 ml | Puffer, NAD |

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

Das Produkt/der Test ist ausschließlich zur Anwendung im Rahmen der Zweckbestimmung geeignet. Die Gebrauchsanweisung ist strikt zu befolgen.

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

3.1. Allgemein

- 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 im Messbereich (siehe Leistungsdaten) im Test einsetzen.

- **Trübe Lösungen** mittels Falten- und ggf. Spritzenfilter filtrieren.
- **Kohlensäurehaltige** Proben entgasen, z.B. durch Filtrieren oder Zentrifugieren.
- **Stark gefärbte und hochkonzentrierte** Proben sollten mit Polyvinylpyrrolidon (PVPP) entfärbt werden.
- **Proteinhaltige** Proben mit Perchlorsäure klären.
- **Stark fetthaltige** Proben in einen Messkolben einwiegen und mit heißem Wasser extrahieren; Probelösung zur Fettabcheidung abkühlen lassen (z. B. 15 min im Eisbad); Messkolben bis zur Marke mit Wasser auffüllen und vor dem Testen filtrieren.
- **Feste und halbfeste Proben** ausreichend homogenisieren und zerkleinern; mit Wasser extrahieren oder in dest. Wasser auflösen und ggf. filtrieren.
- **Stark saure** Proben durch Zugabe von Natrium- oder Kaliumhydroxidlösung auf ca. pH 8,0 einstellen.

3.2. Bestimmung von L-Glutaminsäure in Sojasauce, Hot Dog Sauce und Ketchup

- Proben mit dest. Wasser in einen Konzentrationsbereich von 10 - 1250 mg/l verdünnen.

3.3. Bestimmung von L-Glutaminsäure in Fleischextrakten, Suppen- oder Brühwürfeln

- Ca. 1 g der Probe in ein Becherglas oder ein 50 ml Zentrifugenröhrchen genau einwiegen.
- 10 - 20 ml dest. Wasser hinzufügen und mischen.
- 10 - 15 Minuten in einem Wasserbad bei 70 °C inkubieren.
- Die warme Suspension in einen 100 ml Messkolben überführen, ca. 15 min im Eisbad abkühlen und anschließend bis zur Marke mit dest. Wasser auffüllen.
- Mittels Papierfilter filtrieren und den ggf. Vorgang wiederholen, bis eine klare Lösung erhalten wird.

3.4. Bestimmung von L-Glutaminsäure in Fleischwaren und Wurst

- 10 g Probe genau in ein Becherglas oder ein 50 ml Plastikröhrchen einwiegen.
- 10 - 20 ml dest. Wasser hinzufügen und mischen.
- 10 - 15 Minuten in einem Wasserbad bei 70 °C inkubieren.
- 1 Tropfen konzentrierte Schwefelsäure zugeben (ggf. unter einem Abzug arbeiten).
- Die warme Suspension in einen 100 ml Messkolben überführen, bei Raumtemperatur abkühlen lassen und nach Abkühlung auf 20 - 25 °C wird bis zur Marke mit dest. Wasser auffüllen.
- Mittels Falten- und ggf. Spritzenfilter filtrieren; den Vorgang wiederholen, bis eine klare Lösung erhalten wird.

3.5. Bestimmung von L-Glutaminsäure in Gemüse- und Obstzerzeugnissen (entspricht der §64-Methode für Tomatenmark und Ketchup)

- Ca. 1 g der Probe in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen genau einwiegen und in 10 - 20 ml dest. Wasser lösen.
- Probe gut mischen (z. B. durch Schütteln oder vortexen).
- Mit dest. Wasser auf ca. 50 ml auffüllen.
- 10 min auf einem Schüttler oder Rollmischer extrahieren.
- Die Suspension in einen 100 ml Messkolben überführen und mit dest. Wasser bis zur Marke auffüllen.
- Mittels Falten- und ggf. Spritzenfilter filtrieren; den Vorgang wiederholen, bis eine klare Lösung erhalten wird.

3.6. Weitere Hinweise

Für die Zugabe von Reagenz 1 und 2 wird die Verwendung einer Multistepper-Pipette empfohlen. Verwenden Sie für jede Komponente eine separate Spitze.

Verwenden Sie für jeden Probenextrakt (und die Kontrolllösungen) separate Spitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden; spülen Sie die Spitze vor dem Pipettieren.

4. Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
 Küvetten: 1 cm Schichtdicke
 Temperatur: 20 - 37 °C (während der Messung)
 Messbereich: 10 - 1250 mg/l (Basisapplikation 100 µl)

	Reagenzleerwert	Probe / Kontrolle
Reagenz 1	2000 µl	2000 µl
Probe / Kontrolle	-	100 µl
Dest. Wasser	100 µl	-
Mischen, 3 min bei 37 °C inkubieren. Extinktion E₁ messen, dann Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, 30 min bei 37 °C inkubieren, Extinktion E₂ messen.		

Der Reagenzleerwert (RLW) muss für **jede** Probe mitbestimmt und vom jeweiligen Probenergebnis abgezogen werden.

Die angegebenen Inkubationszeiten können je nach vorherrschenden Laborbedingungen und abhängig von der Pipettiergenauigkeit variieren. Es wird daher empfohlen bei den ersten Durchläufen das Ende der Reaktion abzuwarten und die Zeiten ggf. anzupassen.

Hinweis: Eine Durchführung des Tests ist grundsätzlich im Temperaturbereich von 20 °C bis 37 °C möglich. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass die Inkubationszeiten des Testes bei 37 °C validiert wurden. Bei Messungen unterhalb der validierten Temperatur wird empfohlen, die Messungen bis zum Endpunkt der Reaktion durchzuführen.

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probelösungen

5.1.1. Gesamtkonzentration L-Glutaminsäure

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)
 RLW: Reagenzleerwert

$$df_{100\mu l} = \frac{\text{Probenvolumen} + \text{Volumen R1}}{\text{Testvolumen}} = 0,808$$

Der angegebene df-Wert von 0,808 gilt für eine Basisapplikation von 100 µl. Eine **Erhöhung des Probenvolumens** (bis 1000 µl; siehe Validierungsbericht) 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. Der Probenleerwert ist dem veränderten Probenvolumen anzupassen.

Die Berechnung der L-Glutaminsäure-Konzentration erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$C_{\text{L-Glutaminsäure}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(E \times d \times v \times 1000)} = 0,6072 \times \Delta E \times F$$

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

V: Testvolumen (Basisapplikation) [ml] = 2,600
 MG: Molekulargewicht L-Glutaminsäure [g/mol] = 147,13
 d: Schichtdicke [cm] = 1,00
 v: Probenvolumen (Basisapplikation) [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 müssen, wird der Gehalt auf die Einwaage bezogen:

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

Beispiel:

$$C_{\text{L-Glutaminsäure}} = 0,454 \text{ g/l} \quad \text{Einwaage} = 5,02 \text{ g/100 ml} \triangleq 50,2 \text{ g/l}$$

$$\text{Gehalt}_{\text{L-Glutaminsäure}} = \frac{0,454 \text{ g/l}}{50,2 \text{ g/l}} \times 100 = 0,904 \text{ g/100 g (oder \%)}$$

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

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

Wir empfehlen dazu die Verwendung von Referenzmaterialien oder Standardlösungen, wie zum Beispiel:

- FAPAS Quality Control Material; Mononatrium-Glutamat (MSG) in Snacks auf Maisbasis (siehe Validierungsbericht für weitere Informationen)
- Enzytec™ Liquid Multi-acid Standard 2 low (E8470) mit 0,25 g/l L-Glutaminsäure

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Die Glutamat-Dehydrogenase ist spezifisch für L-Glutaminsäure. Es wurden keine Nebenaktivitäten identifiziert.

6.2. Interferenzen

L-Ascorbinsäure interferiert nicht bei oder unter 0,5 g/l. Im Falle von Sulfid wurden bei oder unter 0,01 g/l keine Interferenzen ermittelt.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Die Linearität ist bis mindestens 1250 mg/l L-Glutaminsäure gegeben. Der empfohlene Messbereich liegt bei 10 - 1250 mg/l für ein Probenvolumen von 100 µl bzw. 2,5 - 150 mg/l für 1000 µl Probe.

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde nach der Methode DIN 32645:2008-11 in stabilisierter wässriger Lösung bestimmt. Daraus ergibt sich ein LoD von 4 mg/l L-Glutaminsäure für ein Probenvolumen von 100 µl und 1 mg/l für 1000 µl Probenvolumen.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde anhand eines Präzisionsprofils bestimmt und bestätigt eine Konzentration von 10 mg/l respektive 2,5 mg/l für 100 µl bzw. 1000 µl Probenvolumen.

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. Grenzen dieser Methode

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

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

Bei der Analyse einer nicht-validierten Matrix wird empfohlen, die erzielten Ergebnisse durch Dotierexperimente zu verifizieren. Falls erforderlich, muss eine geeignete Probenvorbereitung für die betreffende Probenmatrix erarbeitet und ggf. validiert werden.

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 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.

