

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

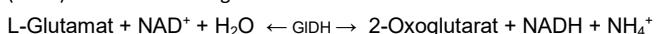
Dieser Test wurde für ausgewählte Proben der folgenden Matrices validiert: Gemüsebrühe und Brühwürfel, Hot Dog Sauce, Gemüsepüree, Wurst, Ketchup, Lasagne Bolognese, Tomatenpesto und Sojasauce. Detaillierte Ergebnisse und weitere Informationen zu den Validierungsdaten finden Sie im Validierungsbericht.

Detaillierte Ergebnisse und 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

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

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

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 im Test einsetzen oder ausreichend auf eine Konzentration innerhalb des angegebenen Messbereichs verdünnen (s. Leistungsdaten).
- 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.
- **Kohlensäurehaltige** Proben entgasen, z.B. durch Filtrieren oder Zentrifugieren.
- **Stark** gefärbte Proben mit Polyvinylpyrrolidon (PVPP; bspw. 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.
- Protein- und fetthaltige Proben alternativ 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.
- 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.
- 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.
- **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 Obsterzeugnissen (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 Multistep-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. Manuelle Testdurchführung

4.1. Allgemeine Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
 Küvetten: 1 cm Schichtdicke
 Temperatur: 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 E_1 messen, dann Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, 30 min bei 37 °C inkubieren, Extinktion E_2 messen.		

4.2. Wichtige Hinweise zur Testdurchführung

- Der Reagenzleerwert (Wasserprobe) muss in **jeder Messserie** mitbestimmt und von **jedem** Probenergebnis abgezogen werden.
- Die angegebenen Inkubationszeiten wurden bei 37 °C validiert und festgelegt.
- Verwenden Sie für jeden Probe und Kontrolllösung separate Spitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden; spülen Sie die Spitze vor dem Pipettieren.
- Für die Zugabe der Reagenzien wird die Verwendung einer Multistep-Pipette mit separaten Spitzen empfohlen.
- 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 sollte (zumindest bei den ersten Testdurchläufen bzw. der Validierung) stets abgewartet werden. Stabilisiert sich die Extinktion nach der angegebenen Inkubationszeit nicht, 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. Konzentration von L-Glutaminsäure in Probelösungen

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünungsfaktor)
 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 Reagenzverdünungsfaktors (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:

$$C_{\text{L-Glutaminsäure}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(E \times d \times v \times 1000)} = 0,5949 \times \Delta E (\times F)$$

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

V: Testvolumen (Basisapplikation) [ml] = 2,600
 MG: Molekulargewicht L-Glutaminsäure [g/mol] = 147,13
 d: Schichtdicke [cm] = 1,00
 v: Probevolumen (Basisapplikation) [ml] = 0,100
 ε: Extinktionskoeffizient NADH [L/mmol x cm] = 6,43 (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:

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

Beispiel:

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

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Die Wiederfindung von Kontrolllösungen sollte innerhalb $100 \pm 5 \%$ 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 L-Glutamic acid Validierungsberichte
- Enzytec™ Liquid L-Glutamic acid Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid L-Glutamic acid Excel-Auswertevorlagen
- Enzytec™ Liquid L-Glutamic acid 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 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 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 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.