

Enzymatische UV-Bestimmung von Harnstoff und Ammoniak in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien  
2 x 50 mL R1 und 2 x 12,5 mL R2 – 50 Tests (manuell) / ≥ 500 Tests (Auto-Analysegerät)

Nur für den Laborgebrauch  
Lagerung bei 2 - 8 °C

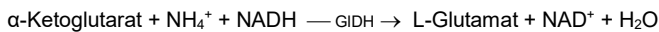
## Methode

Enzymatischer UV-Test mit Urease und Glutamat-Dehydrogenase (GIDH). Das Ergebnis umfasst die Summe aus Ammoniak nach Harnstoffspaltung und freiem Ammoniak. Zur Differenzierung muss das freie Ammoniak in einem separaten Test unter Verwendung von E8390 Enzytec™ Liquid Ammonia bestimmt und vom Ergebnis dieses Tests E8395 Enzytec™ Liquid Urea/Ammonia abgezogen werden.

## Testprinzip

Das Enzym Urease spaltet Harnstoff zu Ammoniak und Kohlendioxid:  
Harnstoff + H<sub>2</sub>O  $\xrightarrow{\text{Urease}}$  2 NH<sub>3</sub> + CO<sub>2</sub>

Ammoniak reagiert mit α-Ketoglutarat in Gegenwart von GIDH und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) zu L-Glutamat und NAD<sup>+</sup>:



Die verbrauchte Menge an NADH ist der umgesetzten Menge an Ammoniak und der halben Menge Harnstoff äquivalent und wird durch eine Abnahme der Extinktion bei 340 nm gemessen.

## Reagenzien

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig.

- Reagenz 1: 2 x 50 mL (Puffer, NADH)
- Reagenz 2: 2 x 12,5 mL (α-Ketoglutarat, Urease, GIDH)

Die Reagenzien sind bei 2 - 8 °C bis zum Monatsende der Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren. Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Chemikalien sollten beachtet werden. Nicht verschlucken! Berührung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten sind den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (MSDS) auf unserer Internetseite ([www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de)) zu entnehmen. Nach Gebrauch die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgen. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

## Probenvorbereitung

- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen in den Messbereich im Test einsetzen.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Feste und halb feste Proben zerkleinern und homogenisieren, geeignete Probemenge mit Perchlorsäure und KOH extrahieren.
- Milchproben mit Trichloressigsäure (z. B. 0,3 M, 1:4) fällen, nach ca. 5 min zentrifugieren und klaren Überstand im Test einsetzen.
- Eine Carrez-Klärung kann nicht angewendet werden!
- Detaillierter Probenaufarbeitungsleitfaden auf Anfrage erhältlich.

## Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm  
Temperatur: 37 °C oder 20 - 25 °C  
Messung: Gegen Luft oder Wasser  
Proben: 8 - 170 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, 3 min bei 20 - 37 °C inkubieren. Extinktion E <sub>1</sub> messen, dann zugeben:		
<b>Reagenz 2</b>	500 µL	500 µL
Mischen, ca. 20 min bei 20 - 37 °C inkubieren. Extinktion E <sub>2</sub> messen.		

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

## Berechnung der Ergebnisse

### Berechnung bei Probelösungen

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

df: dilution factor (Reagenzverdünungsfaktor)  
RLW: Reagenzleerwert

$$df = \frac{(\text{Probevolumen} + R1)}{(\text{Testvolumen})} = 0,808$$

$$C_{\text{Harnstoff}} [\text{g/L}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(\epsilon \times 2 \times d \times v \times 1000)}$$

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

Hieraus ergibt sich für eine Messung bei 340 nm:

$$C_{\text{Harnstoff}} [\text{g/L}] = 0,1239 \times \Delta E$$

### Berechnung bei Feststoffen

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

### Differenzierung von Harnstoff und freiem Ammoniak

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

## Leistungsdaten

### Spezifität

Der Test ist spezifisch für Harnstoff/Ammoniak und zeigt keine Nebenaktivitäten oder Interferenzen mit relevanten org. Säuren, Zuckern oder Konservierungsstoffen wie Ascorbinsäure. Sulfid und Citronensäure interferieren nicht bei oder unter 6,25 g/L bzw. 25 g/L.

### Linearität & Messbereich

Linearität ist bis 190 mg/L Harnstoff gegeben. Der empfohlene Messbereich liegt zwischen 8 und 170 mg/L Harnstoff.

### Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze (LoD) und die Quantifizierungsgrenze (LoQ) wurden 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 4,0 mg/L und ein LoQ von 8,0 mg/L.

Für ein maximales Probenvolumen von v = 1000 µL und einem Testvolumen von V = 3,5 mL wurden theoretische LoD- und LoQ-Werte mittels Berechnung nach Lambert-Beer ermittelt.

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt ΔE = 0,005. Daraus ergibt sich ein LoD von 0,08 mg/L. Auf Basis von ΔE = 0,020 wurde ein LoQ von 0,33 mg/L errechnet.

### Automatisierung & Validierungsberichte

Applikationsempfehlungen für Auto-Analysegeräte und Kundenvalidierungsberichte sind auf Anfrage erhältlich.

### 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.