

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

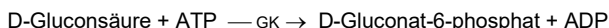
Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

Methode

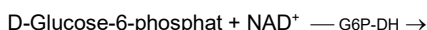
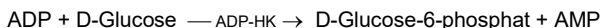
Enzymatische UV-Bestimmung von D-Gluconsäure und D-Glucono-δ-lacton mit Gluconatkinase (GK), ADP-abhängiger Hexokinase (ADP-HK) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH).

Testprinzip

D-Gluconsäure wird mittels ATP in Gegenwart des Enzyms GK zu D-Gluconat-6-Phosphat umgesetzt:



Das entstehende ADP wird mit D-Glucose über eine ADP-HK zu D-Glucose-6-phosphat umgewandelt:



Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) wird dabei zu NADH reduziert. Die verbrauchte Menge an NAD ist der umgesetzten Menge an D-Gluconsäure äquivalent und wird bei 340 nm vermessen.

Reagenzien

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig.

- Reagenz 1: 2 x 50 mL (Puffer, NAD)
- Reagenz 2: 2 x 12,5 mL (ADP-HK, G6P-DH, GK)

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) zu entnehmen. Nach Gebrauch die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgen. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

Probenvorbereitung

- Proben mit 5 M NaOH auf einen pH-Wert von 10 - 11 einstellen.
- Flüssige und klare Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen in den Messbereich im Test einsetzen (siehe Leistungsdaten).
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Feste Proben zerkleinern und homogenisieren, geeignete Probemenge einwiegen und mit Wasser extrahieren.
- Zur Klärung proteinhaltiger Proben empfiehlt sich eine Aufarbeitung mit Perchlorsäure oder Trichloressigsäure.
- Stark gefärbte Proben ggf. mit PVPP entfärben.
- Detaillierter Probenaufarbeitungsleitfaden auf Anfrage erhältlich.

Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
Temperatur: 37 °C oder 20 - 25 °C
Messung: gegen Luft oder Wasser
Proben: 2 - 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 zugeben:		
Reagenz 2	500 µL	500 µL
Mischen, das Ende der Reaktion abwarten (ca. 10 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.

Berechnung der Ergebnisse

Berechnung bei Probelösungen:

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

df: dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)
RLW: Reagenzleerwert

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

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

V: Testvolumen [mL] = 2,600
MG: Molekulargewicht [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)

Hieraus ergibt sich für eine Messung bei 340 nm:

$$C_{\text{Gluconsäure}} [\text{g/L}] = 0,809 \times \Delta E$$

Berechnung bei Feststoffen:

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

Leistungsdaten

Spezifität

Der Test ist spezifisch für D-Gluconsäure und zeigt keine Nebenaktivitäten oder Interferenzen mit anderen relevanten Säuren. In Gegenwart von D-/L-Äpfelsäure sowie D-, L- und meso-Weinsäure konnten bis 6,25 g/L keine Interferenzen ermittelt werden. Sulfit zeigte bei oder unter einer Konzentration von 0,75 g/L keine Interferenzen.

Linearität & Messbereich

Linearität ist bis 2000 mg/L D-Gluconsäure gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 2 und 1500 mg/L liegt. Wird dieser Bereich überschritten, sollten die Proben mit dest. Wasser auf eine Konzentration innerhalb des Messbereichs verdünnt werden. Der Verdünnungsfaktor ist bei der Berechnung zu berücksichtigen.

Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze (LoD) und die Quantifizierungsgrenze (LoQ) wurden nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung ermittelt:

- Probenvolumen v = 100 µL: LoD = 1,44 mg/L
LoQ = 2,49 mg/L
- Probenvolumen v = 1000 µL: LoD = 0,25 mg/L
LoQ = 0,42 mg/L

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.