

UV-Test zur Bestimmung von Essigsäure 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 geprüft: Weine, Säfte, Saucen/Remoulade, Kombucha, Bier, Wurstwaren/Fleisch, Essig und mikrobiologische Kulturmedien.

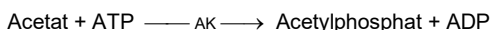
Detaillierte Ergebnisse und weitere Informationen zu den entsprechenden Validierungsdaten sind dem Validierungsbericht zu entnehmen.

Der Test wurde als AOAC *Official Method of Analysis* 2024.01 First Action zugelassen. Eine Publikation ist im J. AOAC Int. 108(3), 395–411 (2025) verfügbar.

Der Test kann auch mit anderen Lebensmitteln oder Probenmaterialien verwendet werden, sofern diese einer individuellen Validierung durch den Anwender unterzogen werden.

1. Testprinzip

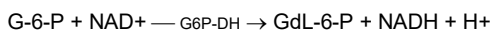
Essigsäure (Acetat) wird in Gegenwart des Enzyms Acetat-Kinase (AK) durch Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu Acetylphosphat und Adenosin-5'-diphosphat (ADP) umgesetzt. Die gebildete Menge an ADP ist äquimolar zur Acetatkonzentration und ist der begrenzende Faktor für die folgenden Schritte:



Für jedes Mol ADP, das in der Reaktion vorhanden ist, wird ein Mol D-Glucose durch eine ADP-abhängige Hexokinase in D-Glucose-6-Phosphat (G-6-P) und Adenosin-5'-monophosphat (AMP) umgewandelt:



In Gegenwart des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) reagieren G-6-P und das Coenzym Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) zu D-Glucono- δ -lacton-6-Phosphat (GdL-6-P):



NAD wird dabei zu NADH reduziert. Die gebildete NADH-Menge wird bei 340 nm gemessen.

Da es keine lineare Beziehung zwischen der Essigsäurekonzentration und der bei 340 nm gemessenen Extinktion E gibt, sind dem Test-Kit vier Kalibratoren mit definierten Konzentrationen beigelegt.

Eine Zwei-Punkt-Kalibrierung führt zu ungenauen Ergebnissen über den gesamten Kalibrierungsbereich.

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, ATP
- Reagenz 2: 2 x 12,5 ml mit Puffer, AK, ADP-HK, G6P-DH
- Kalibrator-Set: 4 x 3,5 ml (20, 100, 300 und 1300 mg/l Acetat)

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.
- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration im Messbereich (siehe Leistungsdaten) einsetzen.
- Die Probelösungen sollten vor der Messung auf Raumtemperatur gebracht werden.
- **Stark** saure Proben durch Zugabe von 1 M KOH auf einen pH-Wert von 6,5 – 7,5 neutralisieren.
- Trübe Proben (z. B. Apfelessig, Säfte): die Testlösung durch einen geriffelten Papier- oder Spritzenfilter filtrieren oder in einem Reaktionsröhrchen zentrifugieren (3000 U/min für mindestens 5 Minuten), bis ein klares Filtrat / ein klarer Überstand entsteht.
- Proben, die Kohlendioxid enthalten (z.B. Bier), durch kurzen Ultraschallimpuls (10 s) oder Rühren in einem Becherglas entgasen.
- **Stark** gefärbte Proben bei Bedarf mit Polyvinylpyrrolidon (PVPP) entfärben.
- Feste und halb feste Proben zerkleinern, homogenisieren und mit Wasser extrahieren. Im Anschluss filtrieren oder zentrifugieren.
- Bei stark fetthaltigen Proben z. B. 5 g in einen 100-ml-Messkolben einwiegen, zur Hälfte mit Wasser füllen und in einem Wasserbad 20 Minuten lang auf 50 – 60 °C erhitzen. Den Kolben nach dem Abkühlen bis zur Marke auffüllen und zur Fettabscheidung für etwa 20 Minuten in den Kühlschrank stellen. Durch einen Faltenfilter filtrieren, um eine klare Probe zu erhalten (die ersten Milliliter verwerfen).
- Bei höheren Probenvolumina (bis zu 1000 μ l) den pH-Wert der Testlösung überprüfen und im Zweifelsfall neutralisieren.

3.2. Säfte und Weine

- Bei unverdünnten Säften und Weinen 0,1 g PVPP auf 10 ml Probe geben und 1 Minute lang rühren oder schütteln.
- Anschließend filtrieren (Papier- oder Spritzenfilter) oder bei 3000 U/min für mindestens 5 Minuten zentrifugieren, bis ein klarer Überstand vorliegt.
- Bei sehr stark gefärbten Proben kann die PVPP-Menge auf bis zu 0,5 g erhöht werden.

3.3. Soßen

- 10 g Probe in einen Becher (z.B. 150 ml) einwiegen, 50 ml Wasser hinzufügen und 10 Minuten lang auf einem Magnetrührer rühren. Falls erforderlich, die Probe während des Rührens auf 60 °C erhitzen.
- Die Suspension quantitativ in einen 100-ml-Messkolben überführen, die Testlösung abkühlen lassen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen.
- 10 ml dieser Suspension in einen zweiten 100-ml-Messkolben überführen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Nach dem Schütteln einen geriffelten Faltenfilter verwenden, um eine klare Testlösung zu erhalten (die ersten ca. 15 ml verwerfen) oder einen Spritzenfilter verwenden.

3.4. Erhitzte Fleischprodukte

- Etwa 10 g einer gut homogenisierten Probe genau in ein wiederverschließbares 50-ml-Kunststoffröhrchen einwiegen und 20 ml destilliertes Wasser hinzufügen.
- Kräftig mit einem Vortexer mischen und mit destilliertem Wasser auf 50 ml auffüllen und 15 Minuten lang bei 70 °C im Wasserbad erhitzen.
- Einen Tropfen Schwefelsäure 98 % hinzufügen und die Suspension quantitativ mit Wasser in einen 100-ml-Messkolben überführen.
- Die Testlösung auf Raumtemperatur abkühlen lassen und den Messkolben mit destilliertem Wasser auffüllen, bis der Meniskus der wässrigen Schicht die 100-ml-Marke erreicht (Fettphase oberhalb der 100-ml-Kalibriermarke).
- Durch Drehen und Schwenken des Messkolbens vorsichtig mischen, anschließend filtrieren (Papier- oder Spritzenfilter) und das Filtrat zur Analyse verwenden (direkt oder nach Verdünnung in den Messbereich).

3.5. Rohe Fleischprodukte

- Bei der Analyse von rohen Fleischprodukten können aufgrund der störenden Wirkung von Enzymen und Substraten im Rohmaterial Schleichreaktionen auftreten.
- Um diese Schleichreaktionen zu verhindern, erhitzen Sie 50 bis 100 g der Probe vor der Homogenisierung 15 Minuten lang auf 75 °C und befolgen Sie anschließend die oben beschriebenen Anweisungen für erhitzte Fleischprodukte.

4. Manuelle Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
 Temperatur (Messung): 20 – 37 °C
 Photometer-Abgleich: gegen Luft (ohne Küvette)
 Messbereich: 20 – 1300 mg/l (für 100 µl)

	Reagenzleerwert	Probe / Kontrolle
Reagenz 1	2000 µl	2000 µl
Probe / Kontrolle	-	100 µl
Dest. Wasser	100 µl	-
Mischen, 3 Minuten bei 20 – 37 °C inkubieren. Extinktion E ₁ messen, dann Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, 15 Minuten bei 20 – 37 °C inkubieren und Extinktion E ₂ messen.		

4.1 Wichtige Hinweise zur Testdurchführung

- Der Reagenzleerwert (Wasserprobe) muss in jeder Messserie mitbestimmt und von jedem Probenergebnis und von jedem Kalibrator abgezogen werden.
- Die angegebenen Inkubationszeiten wurden bei 25 °C validiert und festgelegt. Die Durchführung des Tests ist grundsätzlich auch im Temperaturbereich von 20 – 37 °C möglich.
- Die Kalibrierkurve sollte visuell überprüft werden, um sicherzustellen, dass die Werte stetig ansteigen. Der erste Term der Polynomgleichung 3. Grades sollte positiv sein. Die gemessene Extinktionsdifferenz der Proben muss innerhalb der Kalibrationskurve liegen.
- Ist die gemessene Extinktionsdifferenz der Proben zu klein, so ist die Probelösung mit höherer Einwaage oder weniger starker Verdünnung erneut herzustellen.
- Ist die Extinktionsdifferenz der Proben sehr groß, so ist die Probelösung gegebenenfalls zu verdünnen.
- Verwenden Sie für jeden Probenextrakt und die Kontrolllösungen separate Spitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden; spülen Sie die Spitze vor dem Pipettieren.
- Für die Zugabe der Reagenzien wird die Verwendung einer Multistep-Pipette empfohlen. Verwenden Sie für jede Komponente eine separate Spitze.
- Zur Durchmischung empfiehlt sich die Verwendung von Rührspateln für jede einzelne Küvette. Diese erst unmittelbar vor den Extinktionsmessungen aus der Küvette nehmen.

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probelösungen

5.1.1. Konzentration Essigsäure

Es gilt die Extinktionsdifferenz ΔE für jede Probe zu berechnen:

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

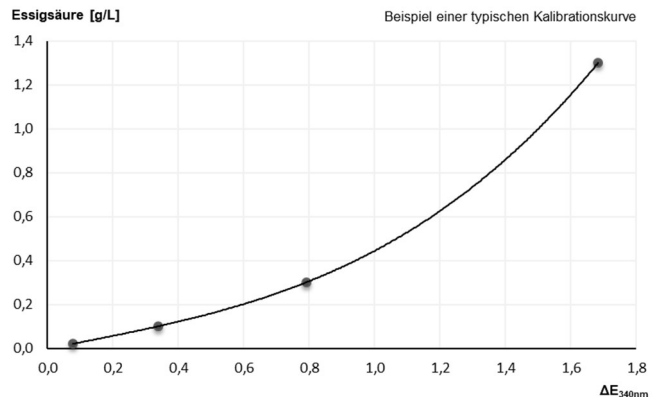
df: Dilution factor (Reagenzverdünungsfaktor)
 RLW: Reagenzleerwert

$$df = \frac{\text{Probenvolumen} + R1}{\text{Testvolumen}} = 0,808$$

Der angegebene df-Wert von 0,808 gilt für eine Basisapplikation von 100 µl. Eine Erhöhung des Probenvolumens ist möglich (max. 1000 µl; siehe Validierungsbericht). Bei gleichbleibenden Reagenzvolumina erfordert dies die Umrechnung des Reagenzverdünungsfaktors (df).

Bei Erhöhung des Probenvolumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es, dies matrix-abhängig zu überprüfen. Der Reagenzleerwert ist dem veränderten Probenvolumen anzupassen.

Die Ermittlung der Kalibrationskurve erfolgt bspw. in Excel über ein Polynom 3. Grades. Dabei werden die Sollwerte der Kalibratoren über die ΔE-Werte aufgetragen. Die Konzentration der Proben wird anhand der Polynomgleichung ermittelt. Eine Excel-Auswertetabelle ist auf Anfrage erhältlich.



Beispiel für eine Kalibrationskurve unter Verwendung einer Polynomkurvenanpassung 3. Ordnung; die Konzentrationswerte sind gegen die entsprechenden ΔE-Werte aufgetragen.

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:

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir den Enzytec™ Liquid Multi-Acid Standard low (Art. Nr. E8460; 0,250 g/l Essigsäure).

Die Wiederfindung des Multi-Standards low sowie anderer wässriger Kontrolllösungen sollte bei 100 ± 5 % liegen.

Als zertifiziertes (Standard-)Referenzmaterial empfehlen wir:

- Acetic acid Standard Lösung, HACH (Art. No. 1420542)

5.4. Kalibration

Die Kalibrationsstabilität beträgt 7 Tage. Die Gültigkeit der Kalibration sollte täglich mit einer Kontrollprobe verifiziert werden.

Zur Sicherstellung der Gültigkeit der Kalibration über den angegebenen Zeitraum (7 Tage), sollten bei jedem Durchlauf wässrige Kontrolllösungen analysiert werden. Sollten diese Kontrolllösungen nicht innerhalb der Spezifikationen liegen, muss eine Neukalibrierung durchgeführt werden.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Der Test ist spezifisch für Acetat und zeigt keine relevanten Nebenaktivitäten gegenüber verwandten Substanzen.

Es wurden hochkonzentrierte organische Säuren auf Nebenaktivitäten im Messsystem untersucht, darunter Sorbinsäure (1 g/l), Fumarsäure (5 g/l), Essigsäureethylester, Benzoesäure, Buttersäure, Citronensäure, Hydroxybuttersäure, D- und L-Milchsäure, D- und L-Äpfelsäure, Ameisensäure, L-Ascorbinsäure, L-Weinsäure, Oxal-essigsäure, Oxalsäure, Propionsäure, Salicylsäure, Shikimisäure und Bernsteinsäure (jeweils 10 g/l).

Lediglich D-Milchsäure, Fumarsäure, Oxalessigsäure und Propionsäure zeigten Messsignale ungleich Null. Diese lagen jedoch unterhalb der Extinktion von Standard 1 (20 mg/l) und wurden deshalb als nicht relevant bewertet.

6.2. Interferenzen

Wichtige organische Säuren wurden in Gegenwart von 1 g/l Essigsäure auf ihre Störwirkung untersucht, darunter D- und L-Äpfelsäure, Ameisensäure, L-Ascorbinsäure, Benzoesäure, Bernsteinsäure, Buttersäure, Citronensäure, Essigsäureethylester, Fumarsäure, Hydroxybuttersäure, D- und L-Milchsäure, Oxalessigsäure, Oxalsäure, Propionsäure, Salicylsäure, Shikimisäure, Sorbinsäure und L-Weinsäure. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit oder der natürlich vorkommenden Konzentrationen wurden unterschiedliche Konzentrationen im Bereich 0,5 g/l – 3 g/l gewählt. Bei all diesen Substanzen traten keine Interferenzen auf.

Auch hohe Konzentrationen von D-Glucose und D-Fruktose (jeweils 150 g/l), Glycerol (25 g/l) und SO2 (1 g/l) zeigten in Anwesenheit von 1 g/L Essigsäure keine Interferenzen.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Linearität ist bis 1500 mg/l Essigsäure gegeben (100 µl Probe). Der empfohlene Messbereich beträgt 20 – 1300 mg/l.

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung ermittelt. Bei einem Probenvolumen von 100 µl beträgt der ermittelte LoD 2,2 mg/l. Bei einem Probenvolumen von 100 µl beträgt die Bestimmungsgrenze (LoQ) 3,8 mg/l.

Die kleinste vom Verfahren zuverlässig unterscheidbare Absorptionsdifferenz beträgt ΔE = 0,005. Durch Erhöhung des Probenvolumens kann die Sensitivität des Tests entsprechend gesteigert werden.

6.4. Automatisierung mittels Pictus 500

6.4.1. Bestimmungsgrenze (LoQ)

P500 Applikation	LoQ
High Range	90 mg/l
Basic Range	16 mg/l

6.4.2. Messbereiche

P500 Applikation	Messbereich
High Range	bis 6,5 g/l
Basic Range	bis 1300 mg/l

6.4.3. Präzision und Richtigkeit

Hier dargestellt sind Daten der Messung einer wässrigen Lösung.

High Range

Zielkonzentration, mg/l	150	1008
Mittelwert, mg/l	153,1	992
SD, mg/l	5,10	10,4
RSD, %	3,3	1,0
Wiederfindung, %	102,1	98,4

Basic Range

Zielkonzentration, mg/l	150	994
Mittelwert, mg/l	152,4	1009
SD, mg/l	1,60	13,4
RSD, %	1,1	1,3
Wiederfindung, %	101,6	100,1

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ Liquid Acetic acid Validierungsbericht
- Enzytec™ Liquid Allgemeines Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid Acetic acid Excel-Auswertevorlage
- Enzytec™ Liquid Acetic acid Technical Information
- Enzytec™ Liquid 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 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 Matrices 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 & 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.