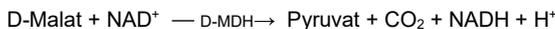


UV-Test zur Bestimmung von D-Äpfelsäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
Test-Kombination für 50 Bestimmungen

Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

1. Testprinzip

D-Äpfelsäure (D-Malat) wird durch Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) in Gegenwart von D-Malat-Dehydrogenase (D-MDH) zu Oxalacetat oxidiert, welches unmittelbar von diesem Enzym in Pyruvat und Kohlendioxid (CO₂) gespalten wird.



Die bei der Reaktion gebildete NADH-Menge ist der D-Äpfelsäure-Menge äquivalent. NADH ist die Messgröße und aufgrund seiner Absorption bei 340 nm zu bestimmen.

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, D-MDH
- Reagenz 2: 2 x 12,5 ml mit 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 zum Monatsende der angegebenen Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren.

2.4. Sicherheit & Entsorgung

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

- Die Probenvorbereitung für die manuelle und die automatisierte Testdurchführung ist identisch.
- Die Proben sollten vor der Messung auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen mit dest. Wasser auf eine Konzentration innerhalb des Messbereichs (siehe Leistungsdaten) im Test einsetzen.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Stark gefärbte Proben gegebenenfalls entfärben.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Feste und halbfeste Proben zerkleinern und homogenisieren und mit Wasser extrahieren; filtrieren oder zentrifugieren.
- Bestimmung von D-Äpfelsäure in Wein und Traubenmost: 25 ml Wein mit 125 mg Calciumhydroxid und 5 ml Ethanol (ca. 98 %) versetzen, 2 min rühren und ggf. mit Kalilauge (1 M) auf pH 7 - 8 einstellen, mit bidest. Wasser quantitativ in einen 50 ml Messkolben überführen, bis zur Marke auffüllen und mischen. Danach durch ein Faltenfilter filtrieren und klares, farbloses oder leicht gefärbtes Filtrat zum Test einsetzen. Stark gefärbte Filtrate und ggf. Filtrate, die eine Schleichreaktion zeigen, müssen entfärbt werden. In diesem Fall wie folgt verfahren: 10 ml Filtrat mit 2 g feuchtem PVPP versetzen, 2 min rühren, durch ein Faltenfilter filtrieren und dieses Filtrat zum Test einsetzen.

4. Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
Temperatur: 20 - 37 °C (während der Messung)
Messung: gegen Luft (ohne Küvette) oder Wasser
Messbereich: 14 - 500 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 Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, 25 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.

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probelösungen

5.1.1. Konzentration D-Äpfelsäure

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)
RLW: Reagenzleerwert

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

Eine Erhöhung des Probenvolumens (bis max. 1000 µl) bei unveränderten Reagenzvolümina erfordert Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors (df). Bei Erhöhung des Volumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es dies Matrix-abhängig zu überprüfen.

$$C_{D\text{-Äpfelsäure}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(E \times d \times v \times 1000)} = 0,5534 \times \Delta E$$

V: Testvolumen Basisapplikation [ml] = 2,600
MG: Molekulargewicht [g/mol] = 134,09
d: Schichtdicke [cm] = 1,00
v: Probevolumen [ml] = 0,100
ε: Extinktionskoeffizient NADH [l/mmol x cm] = 6,3 (bei 340 nm)

5.2. Berechnung bei Feststoffen

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir Enzytec™ Liquid Multi-Acid Standard low (E8460).

Die Wiederfindung des Enzytec™ Liquid Multi-Acid Standard low sowie anderen wässrigen Kontrolllösungen sollten innerhalb 100 ± 5 % liegen.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Die Bestimmung ist spezifisch für D-Äpfelsäure. L-Weinsäure ist nebenaktiv und führt zu einer Schleichreaktion. Aus diesem Grund muss vor der Messung wie im Kapitel 3 „Probenvorbereitung“ beschrieben diese entfernt werden. Eine verbleibende Restmenge an L-Weinsäure nach der Fällung kann zu einer geringen Schleichreaktion führen, die jedoch durch rechnerische Extrapolation berücksichtigt werden kann.

6.2. Interferenzen

α -Ketoglutar säure und Sulfit interferieren nicht bei einer Konzentration bis zu 0,5 g/l. Meso-Weinsäure interferiert nicht bei einer Konzentration bis zu 0,2 g/l.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Die Linearität ist bis 500 mg/l D-Äpfelsäure gegeben (100 μ l Probenvolumen). Für ein Probenvolumen von 1000 μ l liegt der empfohlene Messbereich zwischen 1,2 und 50 mg/l.

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung ermittelt. Hieraus ergibt sich bei einem Probenvolumen von 100 μ l ein LoD von 3,7 mg/l bzw. 0,38 mg/l bei einem Probenvolumen von 1000 μ l.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde mittels Präzisionsprofil ermittelt und beträgt 14 mg/l bei einem Probenvolumen von 100 μ l und 1,2 mg/l bei einem Probenvolumen von 1000 μ l.

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt $\Delta E = 0,005$. Für ein Probenvolumen von $v = 1000 \mu$ l ergibt sich ein errechnetes LoD von 0,37 mg/l. Auf Basis von $\Delta E = 0,010$ wurde ein LoQ von 0,74 mg/l errechnet.

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. Dienstleistungen & technischer Support

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Leistungen:

- Kundenspezifisches Troubleshooting
- Daten- & Ergebnisanalyse
- Kunden-Workshops & Webinare
- Automatisierung: applikativer Support und technischer Service

9. 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.