

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

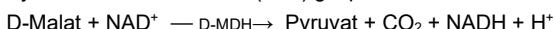
Dieser Test wurde mit den folgenden Matrices getestet: Limonaden und Erfrischungsgetränke, Fruchtsäfte, Tomatensaft, weißer und roter Traubensaft, Weiß- und Rotwein.

Detaillierte Ergebnisse und weitere Informationen zu den Validierungsdaten finden Sie im Validierungsbericht.

Andere Lebensmittel oder Probenmaterialien können getestet werden und müssen vom Anwender validiert werden.

## 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 ( $\text{CO}_2$ ) 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<sup>+</sup>

### 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

Das Produkt/der Test ist ausschließlich zur Anwendung im Rahmen der Zweckbestimmung geeignet. Die Gebrauchsanweisung ist strikt zu befolgen.

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.
- Proben vor der Messung auf Raumtemperatur bringen.
- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen mit dest. Wasser auf eine Konzentration innerhalb des Messbereichs (siehe Leistungsdaten) im Test einsetzen.
- Stark saure oder alkalische Proben mit NaOH/KOH oder HCl auf pH 7 - 8 einstellen und 15 Minuten lang inkubieren.
- Falls erforderlich, gefärbte Proben auf pH 7 - 8 einstellen und gegen eine Blindprobe messen.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.

- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Feste und halbfeste Proben zerkleinern und homogenisieren und mit Wasser extrahieren (z.B. 30 min bei 60 °C). Filtrieren, zentrifugieren oder bei Bedarf Carrez-Klärung anwenden.
- Stark fetthaltige Proben in einen Messkolben einwiegen und mit heißem Wasser extrahieren; Probelösung zur Fettabscheidung abkühlen lassen (z.B. 15 min im Eisbad); Messkolben bis zur Marke mit Wasser auffüllen, wässrige Lösung vor dem Testen filtrieren.
- Proben mit einer Citronensäure oder D-threo-Isocitronensäure-Konzentration größer oder gleich 1 g/l, wenn möglich verdünnen oder die zweite Inkubation auf 30 Minuten verlängern.

### 3.1. Bestimmung von D-Äpfelsäure in Wein und rotem Traubenmost

- Zur Ausfällung von Weinsäure: 25 ml Wein mit 125 mg Calciumcarbonat und 5 ml Ethanol (ca. 98 %) versetzen, 2 min röhren und ggf. mit KOH (1 M) auf pH 7 - 8 einstellen
- Mit dest. Wasser quantitativ in einen 50-ml-Messkolben überführen, bis zur Marke auffüllen, mischen und 30 Minuten auf Eis inkubieren. Danach durch einen Faltenfilter filtrieren.
- Klares, farbloses oder leicht gefärbtes Filtrat im Test einsetzen.
- Stark gefärbte Filtrate und Filtrate, die eine Schleichreaktion zeigen, müssen entfärbt werden: 10 ml Filtrat mit 2 g feuchtem PVPP versetzen, 2 min röhren, durch einen Faltenfilter filtrieren oder zentrifugieren (5 min, 4000 rpm) und im Test einsetzen.

### 3.2. Bestimmung von D-Äpfelsäure in weißem Traubenmost

- Einen Spritzenfilter (PES, 0,22 µm) verwenden, um eine geeignete Menge des weißen Traubenmosts zu filtrieren.
- Anschließend 125 mg Calciumcarbonat und 5 ml Ethanol (ca. 98 %) zu 25 ml Probe hinzugeben, 2 min röhren und den pH-Wert bei Bedarf mit Salzsäure (2 M) auf 7 - 8 einstellen.
- Quantitativ in einen 50-ml-Messkolben überführen, mit dest. Wasser bis zur Markierung auffüllen und 30 Minuten auf Eis inkubieren.
- Filtrieren und das klare Filtrat für die Bestimmung verwenden.

## 4. Manuelle Testdurchführung

Wellenlänge:	340 nm
Temperatur:	20 - 37 °C (während der Messung)
Photometer-Abgleich:	gegen Luft (ohne Küvette)
Messbereich:	14 - 500 mg/l (für 100 µl Probe)

	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 Zugabe von:		
<b>Reagenz 2</b>	500 µl	500 µl
Mischen, 25 min bei 20 - 37 °C inkubieren und Extinktion E <sub>2</sub> messen.		

### 4.1. Wichtige Hinweise zur Testdurchführung

- Der Reagenzleerwert (Wasserprobe) muss bei jedem Lauf einmalig bestimmt und von jedem Probenergebnis abgezogen werden.
- Die Durchführung des Tests ist grundsätzlich im Temperaturbereich von 20 °C bis 37 °C möglich. Es wird darauf hingewiesen, dass die Inkubationszeiten des Tests ausschließlich bei 25 °C (manuelle Abarbeitung) und 37 °C (automatisierte Abarbeitung) ermittelt und validiert wurden. Bei Messungen unter oder überhalb der validierten Temperaturen wird empfohlen, die Messungen bis zum Endpunkt durchzuführen, sofern in der Testkitbeschreibung dieser Bereich angegeben ist.

- Die angegebenen Inkubationszeiten können je nach vorherrschenden Laborbedingungen und abhängig von der Pipettiergenauigkeit variieren. Es wird daher empfohlen bei den ersten Durchläufen das Ende der Reaktion abzuwarten und die Zeiten ggf. anzupassen.
- Falls die Reaktion nach der angegebenen Inkubationszeit nicht zum Stillstand gekommen ist, sollten die Extinktionen in 2-min-Abständen weiter gemessen werden, bis eine konstante Extinktionszunahme pro 2 min erreicht wird. Wurden konstante Extinktionszunahmen festgestellt, so werden die Extinktionen  $E_2$  auf die Zeit der Zugabe von Reagenz 2 extrapoliert.
- Zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses sollten die gemessenen Extinktionsdifferenzen üblicherweise mindestens 0,050 - 0,100 Extinktioneinheiten betragen.
- Ist die gemessene Extinktionsdifferenz zu klein (z.B.  $\Delta E < 0,02$ ), so ist das Probenvolumen ( $v$ ) bis auf maximal 1000  $\mu\text{l}$  zu erhöhen oder die Probelösung erneut herzustellen (höhere Einwaage oder weniger starke Verdünnung).
- Verwenden Sie für jeden Probenextrakt und die Kontrolllösungen separate Spitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden; spülen Sie die Spitzte vor dem Pipettieren.
- Zur Durchmischung empfiehlt sich die Verwendung von Rührspateln für jede einzelne Kuvette. Diesen erst unmittelbar vor den Extinktionsmessungen aus der Kuvette nehmen.
- Für die Zugabe von Reagenz 1 und 2 wird die Verwendung einer Multistepper-Pipette empfohlen. Verwenden Sie für jede Komponente eine separate Spitzte.

## 5. Berechnung der Ergebnisse

### 5.1. Berechnung bei Probelösungen

#### 5.1.1. Konzentration D-Äpfelsäure

Es gilt die Extinktionsdifferenz  $\Delta E$  für jede Probe zu berechnen:

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)  
RLW: Reagenzleerwert

$$df_{100\mu\text{l}} = \frac{\text{Probenvolumen} + R1}{\text{Testvolumen}} = 0,808$$

Der angegebene df-Wert von 0,808 gilt für eine Basisapplikation von 100  $\mu\text{l}$ . Eine Erhöhung des Probenvolumens ist möglich (max. 1000  $\mu\text{l}$ ; siehe Validierungsbericht). Bei gleichbleibenden Reagenzvolumina erfordert dies die Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors (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 Berechnung der D-Äpfelsäure-Konzentration erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

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

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

V:	Testvolumen Basisapplikation [ml]	= 2,600
MG:	Molekulargewicht D-Äpfelsäure [g/mol]	= 134,09
d:	Schichtdicke [cm]	= 1,00
v:	Probenvolumen (Basisapplikation) [ml]	= 0,100
$\epsilon$ :	Extinktionskoeffizient NADH [1/mmol x cm]	= 6,3 (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:

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

### 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) mit 0,250 g/l D-Äpfelsäure oder D-Malic acid, Carl Roth (Art. No. 8633.1)  $\geq 99\%$  p.a. 134,09 g/mol.

Zur Herstellung einer 5 g/l D-Äpfelsäure-Kontrolllösung die erforderliche Menge der Substanz (z.B. 125 mg D-Äpfelsäure) in einen 25-ml-Messkolben einwiegen, mit Wasser auflösen und den Kolben bis zur Markierung mit Wasser auffüllen.

Andere Konzentrationen (z.B. für Dotierversuche) können durch Verdünnung dieser Stammlösung mit dest. Wasser hergestellt werden. Die Aliquote sind bei 2 - 8 °C einen Monat lang haltbar.

Die Wiederfindung dieses Multi-Standards low sowie anderen wässrigen Kontrolllösungen sollte bei  $100 \pm 5\%$  liegen.

Als zertifiziertes (Standard) Referenzmaterial empfehlen wir:

- LGC Fruit juice organic acid mixture (DRE-GS09000056WA);  $c = 1,998 \pm 0,11 \text{ g/l}$  ( $k = 2$ ) D/L-malic acid.
- Standardwein der deutschen Weinanalytiker (Standard wine of the German wine analysts);  
<https://www.weinanalytiker.de/standard-testloesung/>
  - Label "orange" lot 1081608:  $c = 0,821 \pm 0,0714 \text{ g/l}$  D-malic acid;  $k = 1$
  - Label "moosgrün" lot 1071505:  $c = 0,397 \pm 0,023 \text{ g/l}$  D-malic acid;  $k = 1$
- D-Malic acid analytical standard, Supelco (Sigma Aldrich) (Art. No. 46940-U), ampule of 100 mg

## 6. Leistungsdaten

### 6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Die Bestimmung ist spezifisch für D-Äpfelsäure. Das Enzym zeigt jedoch eine Schleichreaktion in Gegenwart von L-Weinsäure, welche in großen Mengen in Traubensaft und in geringeren Mengen in Wein vorkommt.

Die Ausfällung von L-Weinsäure mit Ethanol und Calciumhydroxid, wie in Abschnitt 3.1. Bestimmung von D-Äpfelsäure in Wein und rotem Traubenmost und Abschnitt 3.2. Bestimmung von D-Äpfelsäure in weißem Traubenmost beschrieben, kann diese Schleichreaktion verhindern. Eine verbleibende Restmenge an L-Weinsäure nach der Fällung kann zu einer geringen Schleichreaktion führen, die jedoch durch rechnerische Extrapolation berücksichtigt werden kann.

Untersuchte Konzentrationen von 0,2 g/l oder 5 g/l Benzoesäure, Zitronensäure, Essigsäure, Glykolsäure, Hydroxybuttersäure, Isocitronensäure, L-Apfelsäure, D-Milchsäure, L-Milchsäure und D-Weinsäure zeigten keine oder im Falle von L-Ascorbinsäure eine vernachlässigbare Nebenaktivität.

### 6.2. Interferenzen

$\alpha$ -Ketoglutaräure und Sulfit interferieren nicht bei einer Konzentration bis zu 0,5 g/l.

Ebenso zeigten Pyrogallol bei oder unter 0,05 g/l sowie meso-Weinsäure bei oder unter 0,2 g/l keine relevante Interferenz.

### 6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Die Linearität ist bis 500 mg/l D-Äpfelsäure gegeben (100  $\mu\text{l}$  Probenvolumen), wobei der empfohlene Messbereich zwischen 14 und 500 mg/l und für ein Probenvolumen von 1000  $\mu\text{l}$  bei 1,2 - 50 mg/l liegt.

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

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde mittels Präzisionsprofil ermittelt und beträgt 14 mg/l bei einem Probenvolumen von 100  $\mu\text{l}$  und 1,2 mg/l bei einem Probenvolumen von 1000  $\mu\text{l}$ .

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt  $\Delta E = 0,005$ . Für ein Probenvolumen von  $v = 1000 \mu\text{l}$  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 D-Malic acid Validierungsbericht
- Enzytec™ Liquid Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid D-Malic acid Excel-Auswertevorlage
- Enzytec™ Liquid D-Malic 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 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 u.a. folgende Dienstleistungen:

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

## 10. 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.