

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

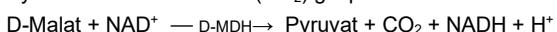
Dieser Test wurde mit ausgewählten Proben der folgenden Matrices geprüft: Limonaden und Erfrischungsgetränke, Frucht- und Gemüsesäfte, Weiß- und Rotwein.

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

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

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

- 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 Minuten bei 60 °C). Filtern, zentrifugieren oder bei Bedarf Carrez-Klärung anwenden.
- Stark fetthaltige Proben in einen Messkolben einwiegen und mit heißem Wasser extrahieren; Extrakt zur Fettabscheidung abkühlen lassen (z.B. 15 Minuten 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 Minuten röhren und den pH-Wert bei Bedarf auf 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 Schleichereaktion zeigen, müssen entfärbt werden: 10 ml Filtrat mit 2 g feuchtem PVPP versetzen, 2 Minuten röhren, durch einen Faltenfilter filtrieren oder zentrifugieren (5 Minuten, 4000 U/min) 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 Minuten röhren und den pH-Wert bei Bedarf 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 Kuvette)
Messbereich:	14 - 500 mg/l (für 100 µl Probe)

	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, 25 Minuten bei 20 - 37 °C inkubieren und Extinktion E_2 messen.		

4.1. Wichtige Hinweise zur Testdurchführung

- Der Reagenzleerwert (Wasserprobe) muss bei jedem Lauf einmalig bestimmt und von jedem Probenergebnis abgezogen werden.
- Die angegebenen Inkubationszeiten wurden bei 37 °C verifiziert und festgelegt. Die Durchführung des Tests ist grundsätzlich auch im Temperaturbereich von 20 °C bis 37 °C möglich.

- Verwenden Sie für jeden Probenextrakt und die Kontrolllösungen separate Spatzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden; spülen Sie die Spitze vor dem Pipettieren.
- Für die Zugabe von Reagenz 1 und 2 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. Diesen erst unmittelbar vor den Extinktionsmessungen aus der Küvette nehmen.
- Das Ende der Reaktion bzw. ein Stillstand der Extinktionen sollte (zumindest bei den ersten Testdurchläufen bzw. der Validierung) stets abgewartet werden. Ist die Extinktion nach der empfohlenen Inkubationszeit nicht zum Stillstand gekommen, sollte weiter in bspw. 5-min-Abständen gemessen werden, bis ein konstanter Extinktionswert erreicht ist.
- Ist die gemessene Extinktionsdifferenz der Proben zu klein (< 0,020), so ist die Probelösung mit höherer Einwaage oder weniger starker Verdünnung erneut herzustellen.
- Ist die Extinktionsdifferenz der Proben sehr groß (bspw. > 1,500), so ist die Probelösung gegebenenfalls zu verdünnen.

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probelösungen

5.1.1. Konzentration D-Äpfelsäure

Es gilt die Extinktionsdifferenz ΔE 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 μl . Eine Erhöhung des Probenvolumens ist möglich (max. 1000 μl ; 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:

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

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
ε :	Extinktionskoeffizient NADH [l/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 (Art. Nr. E8460; 0,250 g/l D-Äpfelsäure) oder D-Äpfelsäure für die Biochemie (z.B. von Carl Roth, Art. Nr. 8633.1 ≥ 99 % p.a., 134,09 g/mol). Die Wiederfindung des Multi-Standards low sowie anderen wässrigen Kontrolllösungen sollte bei $100 \pm 5\%$ liegen.

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.

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 Benzoësäure, Zitronensäure, Essigsäure, Glykolsäure, Hydroxybuttersäure, Isocitronensäure, L-Äpfelsäure, D-Milchsäure, L-Milchsäure und D-Weinsäure zeigten keine oder im Falle von L-Ascorbinsäure eine vernachlässigbare Nebenaktivität.

6.2. Interferenzen

α -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 μl Probenvolumen), wobei der empfohlene Messbereich zwischen 14 und 500 mg/l und für ein Probenvolumen von 1000 μl 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 μl ein LoD von 3,7 mg/l bzw. 0,38 mg/l bei einem Probenvolumen von 1000 μl .

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

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 Allgemeines 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 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 und 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 STILL-SCHWEIGENDEN 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.