

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

Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

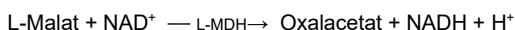
Dieser Test wurde mit ausgewählten Proben der folgenden Matrices geprüft: Wein, Bier, Limonaden, Obst- und Gemüseprodukte.

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

L-Apfelsäure (L-Malic) wird durch Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) in Gegenwart des Enzyms L-Malat-Dehydrogenase (L-MDH) zu Oxalacetat und NADH oxidiert:



NAD wird dabei zu NADH reduziert. Die gebildete NADH-Menge ist proportional zur Konzentration von L-Apfelsäure in der Probe und wird bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

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, L-Glutamat, GOT
- Reagenz 2: 2 x 12,5 ml mit Puffer, NAD, L-MDH

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 dest. Wasser auf eine Konzentration innerhalb des Messbereichs (siehe Leistungsdaten) im Test einsetzen.
-

- Die Proben sollten vor der Messung auf Raumtemperatur gebracht werden.
- **Stark** saure Proben durch Zugabe von 1 M KOH oder NaOH oder alkalische Proben durch Zugabe von HCl auf einen pH-Wert von ca. 7 – 8 neutralisieren.
- Trübe Proben (z. B. Sauerkroutsaft, Ananassaft): die Testlösung durch einen geriffelten Papier- oder Spritzenfilter filtrieren oder in einem Reaktionsröhrchen zentrifugieren (empfohlen werden 3000 U/min für mindestens 5 Minuten), bis ein klares Filtrat oder ein klarer Überstand entsteht.
- Proben, die Kohlendioxid enthalten (z. B. Bier), durch Rühren in einem Becherglas entgasen.
- **Stark** gefärbte Proben bei Bedarf mit Polyvinylpyrrolidon (PVPP, z. B. 1 g/100 ml Probe) entfärben. Die Probe 1 Minute lang rühren oder schütteln und filtern oder bei 3000 U/min für mindestens 5 Minuten zentrifugieren, bis ein klarer Überstand vorliegt.
- Feste und halb feste Proben zerkleinern und homogenisieren und mit Wasser extrahieren. Filtrieren, zentrifugieren oder bei Bedarf Carrez-Klärung anwenden.
- Protein- und fetthaltige Proben mit Carrez-Reagenzien klären: Geeignete Probenmenge in einen 100 ml Messkolben genau einwiegen bzw. pipettieren und ca. 60 ml destilliertes Wasser hinzufügen. Anschließend 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3 \text{H}_2\text{O}/100 \text{ ml}$), 5 ml Carrez-II-Lösung (7,20 g Zinksulfat $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}/100 \text{ ml}$) und 10 ml 0,1 M NaOH zugeben. Nach jeder Zugabe gut mischen. Messkolben mit destilliertem Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren (die ersten Milliliter verwerfen).
- 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 Fettabcheidung für etwa 20 Minuten in den Kühlschrank stellen. Durch einen Faltenfilter filtrieren, um eine klare/leicht trübe Probe zu erhalten.
- Bei höheren Probenvolumina (bis zu 1000 µl) den pH-Wert der Testlösung überprüfen und im Zweifelsfall neutralisieren.

4. Manuelle Testdurchführung

Wellenlänge:	340 nm
Temperatur (Messung):	20 – 37 °C
Photometer-Abgleich:	gegen Luft (ohne Küvette)
Messbereich:	15 – 500 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 E₁ messen , dann Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, 15 Minuten bei 20 – 37 °C inkubieren und Extinktion E₂ messen .		

4.1 Wichtige Hinweise zur Testdurchführung

- Der Reagenzleerwert (Wasserprobe) **muss in jeder Messerie** mitbestimmt und von **jedem** Probenergebnis 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.
- 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 Multistepper-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.
- 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.
- Sollte eine Schleichreaktion auftreten, ist die Reaktion nach den angegebenen Inkubationszeiten noch nicht abgeschlossen und zeigt in der Regel einen konstanten Anstieg von ΔE. Berechnen Sie den analyt-spezifischen ΔE-Wert, indem Sie die Absorptionswerte gegen die Zeit auftragen und eine lineare Regression durchführen, um die Anstiegsrate von ΔE pro Minute in Relation zur Schleichreaktion zu bestimmen. Extrapolieren Sie dann die Absorption auf den Zeitpunkt der Reagenz-2-Zugabe.
- 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 L-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

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

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 L-Äpfelsäure-Konzentration erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

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

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

V: Testvolumen Basisapplikation [ml] = 2,600
MG: Molekulargewicht L-Äpfelsäure [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

Bei der Analyse fester und halbfester Proben, die für die Extraktion der Probe eingewogen werden müssen, wird der Gehalt auf die Einwaage bezogen:

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

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

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

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität

Die Bestimmung ist spezifisch für L-Äpfelsäure.

6.2. Interferenzen

Mögliche Interferenzen wurden durch die Untersuchung strukturell verwandter organischer Säuren bei definierten Konzentrationen geprüft.

Essigsäure, Ascorbinsäure, Buttersäure, Isobuttersäure, D-Milchsäure, L-Milchsäure und Propionsäure zeigten selbst bei Konzentrationen von bis zu 50 g/l keinen Einfluss auf die Bestimmung von L-Äpfelsäure.

Zitronensäure, Maleinsäure, Bernsteinsäure, Weinsäure, D-Äpfelsäure und 2-Hydroxybuttersäure interferierten nicht mit dem Test bei Konzentrationen unterhalb von 5 g/l.

Aufgrund der begrenzten Löslichkeit konnten L-Asparaginsäure und Fumarsäure nur bis zu Konzentrationen von 4,0 g/L bzw. 4,9 g/L geprüft werden und zeigten hierbei keinen Einfluss.

Eine signifikante Interferenz wurde für Meso-Weinsäure und Oxalacetat beobachtet. Eine zuverlässige Quantifizierung von L-Äpfelsäure ist nur gewährleistet, wenn die Oxalacetat unter 0,5 g/l und Meso-Weinsäure unter 0,005 g/l liegt.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Linearität ist bis 500 mg/l L-Äpfelsäure gegeben (100 µl Probe). Der empfohlene Messbereich beträgt 15 – 500 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 die berechnete LoD 8,0 mg/l.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde mittels Präzisionsprofil ermittelt und beträgt 15,0 mg/l bei einem Probenvolumen von 100 µl.

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	125 mg/l
Basic Range	15 mg/l
Sensitive Range	3,5 mg/l

6.4.2. Messbereiche

P500 Applikation	Messbereich
High Range	bis 2,5 g/l
Basic Range	bis 500 mg/l
Sensitive Range	bis 50 mg/l

6.4.3. Präzision und Richtigkeit

Hier dargestellt sind Daten der Messung einer wässrigen Lösung.

High Range

Zielkonzentration, mg/l	200	500
Mittelwert, mg/l	203,6	505,7
SD, mg/l	4,02	4,44
RSD, %	1,98	0,88
Wiederfindung, %	101,8	101,1

Basic Range

Zielkonzentration, mg/l	200	500
Mittelwert, mg/l	204,7	501,3
SD, mg/l	0,92	1,29
RSD, %	0,45	0,26
Wiederfindung, %	102,4	100,3

Sensitive Range

Zielkonzentration, mg/l	20	50
Mittelwert, mg/l	20,42	49,94
SD, mg/l	0,09	0,35
RSD, %	0,43	0,69
Wiederfindung, %	102,1	99,9

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ Liquid L-Malic acid Validierungsbericht
- Enzytec™ Liquid Allgemeines Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid L-Malic acid Excel-Auswertevorlage
- Enzytec™ Liquid L-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 & 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

- Die Gebrauchs- oder Sicherheitsanweisungen eines Produktes zu lesen, zu verstehen oder zu befolgen;
- geschultes und qualifiziertes Personal für das Produkt einzusetzen;
- geeignete Industriestandards- und Praktiken anzuwenden, insbesondere Good Laboratory Practices;
- für das Produkt geeignete Kontroll-/Proben-/Probenmatrices oder Abarbeitungsverfahren/Prozesse einzusetzen und dies, soweit erforderlich, zu überprüfen;
- sonstige fehlerhafte Benutzung;
- Veränderung oder Bearbeitungen der Produkte
- unsachgemäße Lagerung durch den Kunden oder Dritte
- Folgen chemischer, elektromagnetischer, mechanischer oder elektrolytischer Einflüsse außerhalb der von R-Biopharm AG dokumentierten Standardbereiche
- 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 GARANTIEEN 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.