

Enzymatischer UV-Test zur Bestimmung von Acetaldehyd in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
Test-Kombination für 50 Bestimmungen

Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

Dieser Test wurde für die folgenden Matrices validiert: Wein, Fruchtsaft, Bier, Likör und Joghurt. Detaillierte Ergebnisse und weitere Informationen zu den Validierungsdaten finden Sie im Validierungsbericht.

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

1. Testprinzip

Acetaldehyd wird durch das Enzym Aldehyd-Dehydrogenase (Al-DH) zu Essigsäure oxidiert:



Die Menge an NADH, die bei dieser Reaktion erzeugt wird, ist stöchiometrisch zur Menge des Acetaldehyds. NADH wird auf Grundlage seiner spezifischen Absorption 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 geräteabhängig. Die Inkubationszeiten bei automatisierter Abarbeitung können gegebenenfalls abweichen und müssen daher verifiziert werden.

- Reagenz 1: 2 x 50 ml mit Puffer, Aldehyd-Dehydrogenase
- 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

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

3.1 Allgemein

- Die Probenvorbereitung für manuelle und automatisierte Tests ist identisch.
- Flüssige, klare und farblose Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnung mit dest. Wasser auf eine Konzentration im Messbereich (siehe Leistungsdaten) im Test einsetzen.
- Trübe Lösungen müssen zentrifugiert oder filtriert werden.
- Lagern Sie die Proben kühl, trocken und lichtgeschützt.

3.1.1 Bestimmung von Acetaldehyd in Joghurt

40 g der Probe mit einer Genauigkeit von 10 mg in ein Falcon-Röhrchen (50 ml) einwiegen, 4 ml 20 % (w/v) Zitronensäure in Wasser hinzufügen, das Röhrchen auf 50 ml mit Wasser auffüllen, verschließen und 5 min auf einem Rotationsschüttler schütteln.

Zentrifugieren des Falcon-Röhrchens bei 3.000 g für 5 min bei 4 °C oder ein Aliquot der resultierenden Suspension in ein Eppendorfgefäß übertragen und die Probe für 5 Minuten bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugieren.

Filtern Sie den Überstand durch einen Spritzenfilter. 1000 µL des Filtrats werden für den Test eingesetzt.

3.1.2 Bestimmung von Acetaldehyd in Rot-/ Weißwein und Saft

Je nach pH-Wert der Probe kann der Wein direkt oder nach pH-Wert-Einstellung verwendet werden (Probenverdünnung berücksichtigen).

Um Acetaldehydverluste zu minimieren, wird empfohlen, die Probe direkt zu messen.

Stark gefärbte Rotweine sollten mit 0,4 g PVPP pro 20 ml Rotwein entfärbt werden; vor der Messung durch einen Spritzenfilter filtern. Probenvolumen: 100 bis 200 µL.

3.1.3 Bestimmung von Acetaldehyd in Likör

20 ml der Probe in ein Falcon-Röhrchen (50 ml) pipettieren. Probe mit 1 M NaOH auf den pH-Wert 8 einstellen. 0,4 g PVPP hinzugeben, Probe vortexen und anschließend bei 3.000 rpm zentrifugieren. Danach Überstand mit einem Spritzenfilter filtern. 500 µL des Filtrats werden im Test verwendet.

3.1.4 Bestimmung von Acetaldehyd in Bier

Bierproben vor der Verwendung mit einem Spritzenfilter entgasen.

3.2 Wichtige Hinweise

Acetaldehyd ist extrem flüchtig (Siedepunkt ca. 21 °C); daher müssen alle Behälter von Proben und Kontrolllösungen fest verschlossen werden.

Aufgrund der hohen Flüchtigkeit von Acetaldehyd ist es immer notwendig, Acetaldehyd haltige Lösungen unter die Oberfläche von Wasser oder Pufferlösungen zu pipettieren, z. B. bei der Herstellung von Proben- oder Kontrolllösungen, insbesondere beim Verdünnen dieser Materialien, oder beim Dosieren dieser Lösungen in die Küvette.

In Gegenwart von Luftsauerstoff wird Acetaldehyd leicht zu Essigsäure oxidiert. Daher müssen die Proben so schnell wie möglich nach der Probenahme analysiert werden.

Für die Zugabe von Reagenz 1 und Reagenz 2 wird eine Multistep-Pipette empfohlen. Für jede Komponente eine einzelne Spitze benutzen.

Verwenden Sie für jeden Probenextrakt (und jede Kontrolllösung) separate Spitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Spülen Sie die Spitze vor dem Pipettieren vor.

4. Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
 Küvetten: 1,00 cm Schichtdicke
 Temperatur: 20 °C (während der Messung)
 Messbereich: 7 - 300 mg/l

Wichtig: Acetaldehyd ist in Lösung sehr flüchtig. Die Probe muss in das Reagenz 1 unter die Oberfläche pipettiert werden.		
	Reagenzleerwert	Probe / Kontrolle
Reagenz 1	2000 µl	2000 µl
Probe / Kontrolle	-	100 µl
Dest. Wasser	100 µl	-
Mischen, für 3 min bei 20 °C inkubieren*. Extinktion E_1 bei 340 nm messen, dann Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, 15 min bei 20 °C inkubieren und Extinktion E_2 messen.		

*Alternativ kann die Messung auch bei 25 °C bzw. 37 °C durchgeführt werden. Die Inkubationszeiten müssen in diesem Fall nicht angepasst werden

Der Reagenzleerwert (RLW) muss für jede Probe mitbestimmt und vom jeweiligen Probenergebnis abgezogen werden.

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probelösungen

5.1.1. Gesamtkonzentration Acetaldehyd

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünungsfaktor)
 RLW: Reagenzleerwert

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

Der angegebene df-Wert von 0,808 gilt für eine Basisapplikation von 100 µl. Eine Erhöhung des Probenvolumens ist ggf. 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.

$$C_{\text{Acetaldehyd}} [\text{mg/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(E \times d \times v)} = \mathbf{181,8 \times \Delta E \times F}$$

Würde der Probenextrakt vor der Messung verdünnt, muss dieses Ergebnis mit dem Vorverdünungsfaktor F multipliziert werden.

V: Testvolumen (Basisapplikation) [ml] = 2,600
 MG: Molekulargewicht [g/mol] = 44,05
 d: Schichtdicke [cm] = 1,00
 v: Probevolumen (Basisapplikation) [ml] = 0,100
 e: Extinktionskoeffizient NADH [L/mmol x cm] = 6,3 (bei 340 nm)

5.2. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Die Wiederfindung von wässrigen Kontrolllösungen sollte innerhalb 100 ± 10 % liegen.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Weitere Aldehyde (z. B. Formaldehyd, Propionaldehyd) können durch das Enzym umgesetzt werden, wenn sie im Lebensmittel vorhanden sind. 5-(Hydroxymethyl)furfural (HMF) wird nahezu mit 100 % wiedergefunden.

6.2. Interferenzen

Natriumsulfit stört diesen Test nicht bei oder unter 1 g/l.
 Ascorbinsäure stört nicht bei oder unter 3 g/l.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Die Linearität ist bis zu 300 mg/l Acetaldehyd gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 7 und 300 mg/l liegt (Probenvolumen 100 µl) und 0,7 mg/l bis 40 mg/L für 1000 µl Probenvolumen. Die Nachweisgrenze (LoD) wurde nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung bestimmt. Daraus ergibt sich eine LoD von 1,5 mg/l respektive 0,2 mg/l Acetaldehyd für ein Probenvolumen von 100 µl bzw. 1000 µl. Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde anhand des Präzisionsprofils bestimmt und bestätigt eine Konzentration von 7 mg/l respektive 0,7 mg/L für 100 µl bzw. 1000 µl Probenvolumen.

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. 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 folgende Leistungen:

- Kundenspezifisches Troubleshooting
- 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.