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 mit ausgewählten Proben der folgenden Matrices validiert: Rot- und Weißwein, Fruchtsaft, Bier, Likör und Joghurt.

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

Acetaldehyd wird in Gegenwart von Aldehyddehydrogenase (Al-DH) und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) quantitativ zu Essigsäure oxidiert:

Acetaldehyd + NAD^+ + H_2O $\xrightarrow{\text{Al-DH}}$ Essigsäure + NADH + H^+

Hierbei wird NAD zu NADH reduziert. Die Menge des gebildeten NADH wird anhand seiner spezifischen Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen und steht in stöchiometrischem Verhältnis zur Menge an Acetaldehyd.

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 Geräte-abhängig.

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

3.1. Allgemein

- Die Probenvorbereitung für die manuelle und die automatisierte Testdurchführung ist identisch.
- Probelösungen vor der Messung auf Raumtemperatur bringen.
- Acetaldehyd verflüchtigt sehr leicht (Siedepunkt ca. 21 °C)! Achten Sie darauf, dass alle Gefäße und Behälter mit Proben und Kontrolllösungen fest verschlossen sind.
- Aufgrund der hohen Flüchtigkeit wird dringend empfohlen, acetaldehydhaltige Lösungen *in* Wasser oder Pufferlösungen zu pipettieren, z.B. bei der Herstellung von Proben- oder Kontrolllösungen, insbesondere beim Verdünnen dieser Stoffe.
- In Gegenwart von (atmosphärischem) Sauerstoff wird Acetaldehyd leicht zu Essigsäure oxidiert; daher müssen die Proben so schnell wie möglich nach der Entnahme analysiert werden.
- Flüssige, klare, farblose und annähernd neutrale Probelösungen direkt im Test einsetzen oder ausreichend verdünnen, um eine Acetaldehyd-Konzentration innerhalb des Messbereichs zu erzielen (siehe Leistungsdaten).
- Bei höheren Probenvolumina (bis zu 1000 µl) den pH-Wert der Testlösung überprüfen und im Zweifelsfall neutralisieren.
- Saure oder schwach gefärbte Proben durch Zugabe von Natrium- oder Kaliumhydroxidlösung auf einen pH-Wert von 7 – 8 einstellen. Die hohe Flüchtigkeit von Acetaldehyd ist kritisch! Um Verluste zu vermeiden, sollte das erforderliche Volumen an Hydroxidlösung im Voraus abgeschätzt werden.
- Stark gefärbte Proben mit Aktivkohle oder PVPP (z.B. 0,1 g/10 ml bis zu 0,5 g/10 ml) behandeln und anschließend filtrieren.
- Bei trüben Proben: 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 / ein klarer Überstand entsteht.
- Kohlensäurehaltige Proben (z.B. Bier) entgasen, entweder durch kurzen Ultraschallimpuls (Ultraschallbad, gefüllt mit eiskaltem Wasser und Eiswürfeln), Rühren in einem Becherglas, Filtern oder Zentrifugieren.
- Lagern Sie die Proben kühl, trocken und lichtgeschützt.

3.2. Bestimmung von Acetaldehyd in Joghurt

- 40 g ± 0.010 g der Probe genau in ein Reaktions- oder Zentrifugenröhrchen (50 ml) einwiegen.
- 4 ml einer 20 % (w/v) Citronensäurelösung in Wasser hinzufügen.
- Mit destilliertem Wasser bis zur Marke auffüllen, verschließen und 5 Minuten lang auf einem Rotationsschüttler schütteln.
- Das Röhrchen 5 Minuten lang bei 3000 U/min und 4 °C zentrifugieren. Alternativ eine kleine Menge der entstandenen Suspension in einen Eppendorf-Becher überführen und 5 Minuten lang bei 14000 U/min und 4 °C zentrifugieren.
- Die Flüssigkeit mithilfe eines Spritzenfilters von den festen Bestandteilen trennen.
- 1000 µl des erhaltenen Filtrats im Test einsetzen.

3.3. Bestimmung von Acetaldehyd in Rot-/ Weißwein und Saft

- Je nach pH-Wert der Probe den Wein direkt oder nach pH-Einstellung verwenden (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 Probe entfärbt werden.
- Vor der Messung den Wein durch einen Spritzenfilter filtrieren.
- 100 – 200 µl der Probenlösung im Test einsetzen.

3.4. Bestimmung von Acetaldehyd in Likör

- 20 ml der Probe in ein Reaktions- oder Zentrifugenröhrchen (50 ml) pipettieren.
- Probe mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 8 einstellen.
- 0,4 g PVPP hinzugeben, mischen und anschließend bei 3000 U/min zentrifugieren.
- Den Überstand durch einen Spritzenfilter filtern.
- 500 µl des erhaltenen Filtrats im Test einsetzen.

3.5. Bestimmung von Acetaldehyd in Bier

- Bierproben vor der Verwendung mit Hilfe eines Spritzenfilters entgasen.

4. Manuelle Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
Temperatur (Messung): 20 – 37 °C
Photometer-Abgleich: gegen Luft (ohne Küvette)
Messbereich: 7 – 300 mg/l

	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, **15 Minuten bei 20 – 37 °C** inkubieren und Extinktion **E_2 messen**.		

Wichtige Hinweise zur Testdurchführung

- Der Reagenzleerwert (Wasserprobe) **muss in jeder Messserie** mitbestimmt und von **jedem** Probenergebnis abgezogen werden.
- Die angegebenen Inkubationszeiten wurden bei einer optimalen Temperatur von 20 °C validiert. Die Durchführung des Tests ist grundsätzlich auch im Temperaturbereich von **20 – 37 °C** möglich, ohne dass die Inkubationszeiten angepasst werden müssen.
  Es ist zu beachten, dass eine Inkubation bei 37 °C zu einer leichten Abflachung der Reaktionskurve führen kann, was eine geringere Wiederfindung von Acetaldehyd zur Folge hat.
- Acetaldehyd ist in Lösung sehr flüchtig. **Die Proben deshalb unterhalb der Oberfläche in Reagenz 1 pipettieren.**
- 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. 2- oder 5-Minuten-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. Konzentration von Acetaldehyd bei Probelösungen

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

$$df = \frac{\text{Probenvolumen [ml]} + \text{Volumen R1 [ml]}}{\text{Testvolumen [ml]}} = 0{,}808$$

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 Reagenz-verdünnungsfaktors (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 Acetaldehyd-Konzentration erfolgt unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$\mathbf{C}_{\text{Acetaldehyd}}\ \mathbf{[mg/l]} = \frac{(V \times MW \times \Delta E)}{(\varepsilon \times d \times v \times 1000)} = \mathbf{181{,}8 \times \Delta E} \times F$$

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

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

5.2. Gehalt von Acetaldehyd 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:

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir u.a. zertifiziertes Referenzmaterial, wie zum Beispiel:

- Acetaldehyd-Lösung, CRM868095, Merck, 100 Ampullen à 1,2 ml, Konzentration: 1000 µg/ml in Wasser; erweiterte Unsicherheit: 70 mg/l (k = 2).

Die Ampulle nach dem Öffnen im Eisbad mit Parafilm verschlossen aufbewahren. Die Wiederfindung von wässrigen Kontrolllösungen und extrahierten Lebensmittelproben sollte 100 ± 10 % betragen.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Die auf Nebenaktivitäten untersuchten Stoffe waren Formaldehyd, Propionaldehyd, Crotonaldehyd, Glykolaldehyd, Benzaldehyd, Glyceraldehyd, Glutaraldehyd und Hydroxymethylfurfural.

Alle diese Substanzen zeigten eine Nebenreaktivität, wobei Benzaldehyd die geringste Aktivität aufwies, Glykolaldehyd einen quantitativen Umsatz zeigte und 5-(Hydroxymethyl)furfural (HMF) eine Nebenaktivität von fast 100 % aufwies.

6.2. Interferenzen

Natriumsulfit, Ascorbinsäure, Ethanol sowie Mischungen aus Zuckern und organischen Säuren wurden hinsichtlich ihrer interferierenden Wirkung in Gegenwart von Acetaldehyd untersucht. Natriumsulfit und Ascorbinsäure in Konzentrationen von 1 g/l bzw. 3 g/l führten zu keinen Interferenzen.

Das Vorhandensein von Ethanol sowie von Mischungen aus organischen Säuren und Zuckern führte bei Anteilen von 50 % bzw. 5 oder 10 g/L zu keiner Störung.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Linearität ist bis 300 mg/l Acetaldehyd gegeben. Der empfohlene Messbereich beträgt 7 – 300 mg/l für 100 µl Probenvolumen und 0,7 – 40 mg/l für 1000 µl Probenvolumen.

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung bestimmt. Bei einem Probenvolumen von 100 µl beträgt der berechnete LoD 1,5 mg/l und bei einem Probenvolumen von 1000 µl 0,2 mg/l.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde anhand des Präzisionsprofils bestimmt und beträgt 7,0 mg/l bzw. 0,7 mg/l Acetaldehyd bei einem Probenvolumen von 100 µl respektive 1000 µl.

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ *Liquid* Acetaldehyde Validierungsbericht
- Enzytec™ *Liquid* Acetaldehyde Excel-Auswertevorlagen
- Enzytec™ *Liquid* Acetaldehyde Technical Information
- Enzytec™ *Liquid* Probenvorbereitungshandbuch
- 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 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 Matrizes 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 STILLSCHWEIGENDEN 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.