

Enzymatischer UV-Test zur Bestimmung von Ethanol in Kombucha, Säften und alkoholfreiem Bier
 AOAC Official MethodSM 2017.07
 Test-Kombination für 50 Bestimmungen

Nur für den Laborgebrauch
 Lagerung bei 2 - 8 °C

1. Testprinzip

Enzymatischer UV-Test mit Alkohol-Dehydrogenase (A-DH). AOAC Official MethodSM 2017.07 für Kombucha, Säfte und alkoholfreies Bier.

In Gegenwart des Enzyms Alkohol-Dehydrogenase (A-DH) wird Ethanol durch Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) zu Acetaldehyd oxidiert. NADH wird gebildet und bei 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 Geräte-abhängig.

- Reagenz 1: 2 x 50 ml mit Puffer
- Reagenz 2: 2 x 12,5 ml mit Puffer, NAD, A-DH

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 zum Monatsende der angegebenen Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren.

2.4. Sicherheit & Entsorgung

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 Sicherheitsdatenblätter (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.
- Die Proben sollten vor der Messung auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen mit dest. Wasser auf eine Konzentration innerhalb des Messbereichs (siehe Leistungsdaten) im Test einsetzen.
- Trübe Lösungen zentrifugieren.
- Stark gefärbte Proben gegebenenfalls entfärben.
- Kohlensäurehaltige Proben durch einen kurzen Ultraschallstoß bei 0 °C entgasen (Ultraschallgerät gefüllt mit Eiswürfeln und destilliertem Wasser).
- Ethanol ist sehr flüchtig; daher beim Verdünnen von Probelösungen immer unter die Oberfläche des Verdünnungsmittels pipettieren; beim Filtrieren einer Probelösung darf das Filtrat nicht tropfen, sondern muss an der Gefäßwand herunterlaufen; das Gefäß vor dem Zentrifugieren fest verschließen.
- Proben mit 0,076 - 0,76 % ABV (0,6 bis 6 g/l Ethanol) sollten 1 + 19 mit Wasser verdünnt werden, z. B. 100 µl Probe in 1900 µl destilliertes Wasser pipettieren.
- Proben mit 0,38 - 3,8 % ABV (3 bis 30 g/l Ethanol) sollten 1 + 99 mit Wasser verdünnt werden, z. B. 100 µl Probe in 9,90 ml destilliertes Wasser pipettieren.

- Andere Verdünnungen, wie z. B. 1:50 oder 1:10, sind möglich, wenn die Ethanolkonzentration der verdünnten Proben innerhalb des Messbereichs liegt (0,03 bis 0,3 g/l).
- Die Verdünnung von ethanolhaltigen Proben mit Wasser ist sehr anfällig für die zur Verdünnung verwendeten Pipettier Volumina. Daher müssen mindestens 100 µl ethanolhaltige Probe in das entsprechende Wasservolumen pipettiert werden; geringere Volumina, z. B. 20 µl, führen zu höheren CVs.
- Verwenden Sie verdünnte Probelösungen innerhalb von 3 Tagen für die Ethanol Messung (Lagertemperatur 4 °C).

4. Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
 Temperatur: 20 - 37 °C (während der Messung)
 Messung: gegen Luft (ohne Küvette) oder Wasser
 Messbereich: 30 - 300 mg/l

	Reagenzleerwert	Probe / Kontrolle
Reagenz 1	2000 µl	2000 µl
Probe / Kontrolle	-	100 µl
Dest. Wasser	100 µl	-
Mischen, 3 min bei 20 - 37 °C inkubieren. Extinktion E ₁ messen, dann Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, 15 min bei 20 - 37 °C inkubieren und Extinktion E ₂ messen.		

Der Reagenzleerwert muss bei jedem Lauf einmalig mitbestimmt und von jedem Probenergebnis abgezogen werden.

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probelösungen

5.1.1. Konzentration Ethanol

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)
 RLW: Reagenzleerwert

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

Eine Erhöhung des Probenvolumens (bis max. 1000 µl) bei unveränderten Reagenzvolumina erfordert Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors (df). Bei Erhöhung des Volumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es dies Matrix-abhängig zu überprüfen.

$C_{\text{Ethanol}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(E \times d \times v \times 1000)} = 0,190 \times \Delta E$

V: Testvolumen Basisapplikation [ml] = 2,600
 MG: Molekulargewicht [g/mol] = 46,07
 d: Schichtdicke [cm] = 1,00
 v: Probenvolumen [ml] = 0,100
 ε: Extinktionskoeffizient NADH [l/mmol x cm] = 6,3 (bei 340 nm)

Alkohol in Volumenprozent:

Vol.-% = C_{Ethanol} [g/l] / 7,8924 (bei 20 °C)

Hinweise:

- Stets R1 vorlegen!
- Aufgrund der hohen Empfindlichkeit, unbedingt in ethanol-freier Umgebung oder mit luftdicht verschlossenen Küvetten arbeiten.
- Das Probenvolumen sollte mindestens 100 µl betragen.
- Präzision ist stark von der Pipettiertechnik abhängig.



5.2. Berechnung bei Feststoffen

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir den Alkohol-Standard (AQ03-015, 300 mg/l Ethanol).

Die Wiederfindung des Alkohol-Standards sowie anderen Kontrolllösungen sollten innerhalb $100 \pm 5 \%$ liegen.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Die eingesetzte Alkohol-Dehydrogenase oxidiert primäre Alkohole. Die Wiederfindung von Ethanol liegt bei ca. 100 %, während andere primäre Alkohole (n-Propanol und n-Butanol) eine niedrigere Wiederfindung zeigen. Sekundäre und tertiäre Alkohole können zu Schleich-Reaktionen führen.

6.2. Interferenzen

Acetaldehyd interferiert nicht unter einer Konzentration von 3000 mg/l. Sulfit interferiert nicht unter einer Konzentrationen von 300 mg/l.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Linearität ist bis 500 mg/l Ethanol gegeben. Wird der empfohlene Messbereich von 30 bis 300 mg/l überschritten, die Proben mit dest. Wasser auf eine Konzentration innerhalb des Messbereichs verdünnen. Verdünnungsfaktor bei der Berechnung berücksichtigen.

Die untere Nachweisgrenze (LoD) und die Quantifizierungsgrenze (LoQ) wurden nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung für ein Probenvolumen von $v = 100 \mu\text{l}$ ermittelt. Hieraus ergibt sich ein LoD von 1,9 mg/l und ein LoQ von 3,3 mg/l.

6.4. Weitere Anwendungen

Die Methode wurde für Kombucha, Säfte und alkoholfreies Bier validiert. Weitere Lebensmittelproben und andere Probenmaterialien können mit dieser Methode untersucht werden, bedürfen jedoch einer zusätzlichen Validierung.

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. Dienstleistungen & technischer Support

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Leistungen:

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

9. 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.