UV-Test zur Bestimmung von Ethanol 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: Kombucha, Säfte und alkoholfreies Bier.

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

Dieser Test wurde als AOAC *Official Method of Analysis*℠ 2017.07 Final Action zugelassen. Eine Publikation ist im Journal of AOAC INTERNATIONAL, 106(2), 341–347 (2023) verfügbar.

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

1. Testprinzip

In Gegenwart des Enzyms Alkohol-Dehydrogenase (A-DH) wird Ethanol durch Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) zu Acetaldehyd oxidiert:

$$\text{Ethanol} + NAD^+ \xrightarrow{\text{A-DH}} \text{Acetaldehyd} + NADH + H^+$$

NAD wird dabei zu NADH reduziert. Die Menge des gebildeten NADH wird bei 340 nm gemessen und entspricht stöchiometrisch der Menge des vorhandenen Ethanols.

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
- 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 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. Allgemeine Hinweise

- Die Probenvorbereitung für die manuelle und die automatisierte Testdurchführung ist identisch.
- Probelösungen vor der Messung auf Raumtemperatur bringen.
- Flüssige, **klare** bzw. leicht gefärbte und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration im Messbereich (siehe Leistungsdaten) einsetzen.
- Trübe Lösungen zentrifugieren.
- **Stark** gefärbte Proben, die unverdünnt gemessen werden (z.B. Säfte), bei Bedarf mit Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) entfärben. Z.B. 0,1 g PVPP auf 10 ml Probe, 1 Minute lang rühren und anschließend filtrieren, bis ein klarer Überstand vorliegt. Die Wiederfindungsrate durch Zugabe einer Dotierlösung überprüfen.
- Kohlensäurehaltige Proben durch einen kurzen Ultraschallstoß bei 0 °C entgasen (Ultraschallgerät gefüllt mit Eiswürfeln und destilliertem Wasser).
- Bei **stark** sauren Proben sollte die Wiederfindungsrate nach Verdünnung mit destilliertem Wasser durch Zugabe einer Dotierlösung überprüft werden.
- **Ethanol ist sehr flüchtig!** Beim Verdünnen von Probenlösungen immer unter die Oberfläche des Verdünnungsmittels pipettieren; beim Filtrieren einer Probenlösung darf das Filtrat nicht tropfen, sondern muss an der Gefäßwand herunterlaufen. Das Gefäß vor dem Zentrifugieren fest verschließen.

3.2. Anwendungsbeispiele

- Klarer Kombucha, alkoholfreies Bier und Säfte mit destilliertem Wasser verdünnen.
- Trüber Kombucha, alkoholfreies Bier und Säfte vor dem Verdünnen zentrifugieren; den Überstand mit destilliertem Wasser verdünnen.
- Zum Verdünnen alkoholhaltiger Proben oder Kontrolllösungen und zum Dosieren von Reagenzien sollte nicht dieselbe Pipette verwendet werden. **Immer mit alkoholfreiem Wasser arbeiten!**
- Proben mit 0,076 – 0,76 % Vol.-% (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 % Vol.-% (3 – 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 – 0,3 g/l).
- Die Verdünnung von ethanolhaltigen Proben mit Wasser ist sehr anfällig für die zur Verdünnung verwendeten Pipettiervolumina. Daher müssen mindestens 100 µl ethanolhaltige Probe in das entsprechende Wasservolumen pipettiert werden; geringere Volumina, z.B. 20 µl, führen zu höheren Variationskoeffizienten.
- Verwenden Sie verdünnte Probenlösungen innerhalb von 3 Tagen für die Ethanol-Messung (Lagertemperatur 4 °C).

4. Manuelle Testdurchführung

Wellenlänge:	340 nm
Temperatur (Messung):	20 – 37 °C
Photometer-Abgleich:	gegen Luft (ohne Küvette)
Messbereich:	30 – 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**.		

4.1 Wichtige Hinweise zur Testdurchführung

- Der Reagenzleerwert (Wasserprobe) **muss in jeder Messserie** 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.
- Aufgrund der hohen Empfindlichkeit, **unbedingt in alkoholfreier Atmosphäre** oder luftdicht verschlossenen Küvetten **arbeiten.**
- Das Probenvolumen sollte mindestens 100 µl betragen.
- **Reagenz 1 sollte stets vorgelegt werden!** Die Präzision des Tests ist allgemein stark von der Pipettiertechnik abhängig.
- Verwenden Sie für jede Probelösung und die Kontrolllösungen separate Spitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden; die Spitze vor dem Pipettieren mehrmals spülen.
- 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-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. Berechnung bei Probelösungen

5.1.1. Berechnung der Ethanol-Konzentration

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. **Bei gleichbleibenden Reagenzvolumina** erfordert dies jedoch 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 Ethanol-Konzentration erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

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

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

V:	Testvolumen Basisapplikation [ml]	= 2,600
MG:	Molekulargewicht Ethanol [g/mol]	= 46,07
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 des Alkoholgehalts in Volumenprozent

Der Alkoholgehalt in Volumenprozent lässt sich über folgende Formel mit der spezifischen Dichte reinen Ethanols bei 20 °C errechnen:

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

5.3. 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:

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

5.4. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

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

Die Wiederfindung dieses Alkohol-Standards sowie anderer *wässriger* Kontrolllösungen sollte bei 100 ± 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 Schleichreaktionen führen.

6.2. Interferenzen

Acetaldehyd interferiert nicht unter einer Konzentration von 3000 mg/l. Sulfit interferiert nicht unterhalb einer Konzentration 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 destilliertem 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 µl ermittelt. Hieraus ergibt sich ein LoD von 1,9 mg/l und ein LoQ von 3,3 mg/l.

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Validierungsberichte für Enzytec™ *Liquid* Ethanol stehen als AOAC Publikationen über folgende Links zur Verfügung:
  I. Determination of Ethanol in Kombucha, Juices, and Alcohol-Free Beer by Enzytec™ *Liquid* Ethanol: Single-Laboratory Validation, First Action 2017.07 https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0466
  II. Determination of Ethanol in Food by Enzymatic Method Enzytec™ *Liquid* Ethanol, Collaborative Study: Final Action 2017.07 https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsac145
- Enzytec™ *Liquid* Ethanol Excel-Auswertevorlage
- Enzytec™ *Liquid* Ethanol Technical Information
- Enzytec™ *Liquid* Probenvorbereitungshandbuch
- 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 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 & 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.