

Enzymatischer UV-Test zur Bestimmung von Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 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: Fleisch- und Fischprodukte, Gemüsepürees und -pulver aus Grünkohl, Kohl, Spinat, Salat, Rucola, Karotten und Milch-/Molkepulver. 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

Nitrat wird durch Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) in Gegenwart des Enzyms Nitrat-Reduktase (NR) zu Nitrit reduziert:



Die Menge an NADPH, die bei dieser Reaktion oxidiert wird, ist stöchiometrisch zur Menge des Nitrats. NADPH wird auf Grundlage seiner spezifischen Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Das Ergebnis wird in mg/L oder mg/kg Nitrat angegeben.

Aufgrund der Schleichreaktion muss nach der zweiten eine dritte OD-Messung nach weiteren **genau** 10 min durchgeführt werden. Die OD-Differenz wird zur Korrektur der Schleichreaktion verwendet.

## 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, NADPH
- Reagenz 2: 2 x 12,5 mL mit Puffer, Nitrat-Reduktase

### 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

- Die Probenvorbereitung für die manuelle und die automatisierte Testdurchführung ist identisch.
- Proben vor der Messung auf Raumtemperatur bringen.
- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen mit dest. Wasser auf eine Konzentration im Messbereich (siehe Leistungsdaten) im Test einsetzen.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Lagern Sie die Proben kühl, trocken und lichtgeschützt.

**Wichtig:** Das enzymatische System ist sehr sensitiv für Nitrat. Stellen Sie sicher, dass die für die Extraktion verwendeten Reagenzien nitratfrei sind, z. B. Wasser und Chemikalien.

- Für die Zugabe von Reagenz 1 und 2 wird die Verwendung einer Multistep-Pipette empfohlen. Verwenden Sie für jede Komponente eine separate Spitze.
- Verwenden Sie für jeden Probenextrakt (und die Kontrolllösungen) separate Spitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden; spülen Sie die Spitze vor dem Pipettieren.
- Stark fetthaltige Proben in einen Messkolben einwiegen und mit heißem Wasser extrahieren; Probelösung zur Fettabscheidung abkühlen lassen (z. B. 15 min im Eisbad); Messkolben bis zur Marke mit Wasser auffüllen und vor dem Testen filtrieren.
- Bei Bedarf stark gefärbte Proben mit PVPP entfärben.
- Zur Klärung von proteinhaltigen Proben wird die Carrez-Klärung empfohlen.
- Carrez-geklärte Proben mit **niedrigen** Nitratkonzentrationen erfordern einen Carrez-Reagenzleerwert (CRLW). Dieser muss hergestellt werden unter Verwendung von 15 mL Carrez-geklärtem Wasser anstelle von 15 g Probe.  
**Wichtig:** Führen Sie die pH-Einstellung mit 1 M NaOH durch. Andernfalls erscheint das Carrez-geklärte Wasser trübe und die Messung wird beeinträchtigt. Diese Lösung wird anstelle des in Abschnitt 4. Testdurchführung erwähnten **Reagenzleerwertes** (RLW) verwendet. Bitte beachten Sie auch die Berechnung in Abschnitt 5. Berechnung der Ergebnisse.

## 4. Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm  
Küvetten: 1,00 cm light path  
Temperatur: 20 - 37 °C (während der Messung)  
Messbereich: 10 - 300 mg/L

|   | RL / CRLW | Probe / Kontrolle |
|---|-----------|-------------------|
| <b>Reagenz 1</b>  | 2000 µL   | 2000 µL           |
| <b>Probe / Kontrolle</b>  | -         | 100 µL            |
| <b>Dest. Wasser</b>   | 100 µL    | -                 |
| Mischen, für 3 min bei 20 - 37 °C inkubieren. Extinktion <b>E<sub>1</sub></b> bei 340 nm messen, dann Zugabe von: |           |                   |
| <b>Reagenz 2</b>  | 500 µL    | 500 µL            |
| Mischen, bei 20 - 37 °C inkubieren und nach <b>genau</b> 20 min Extinktion <b>E<sub>2</sub></b> messen.           |           |                   |
| Inkubieren, nach weiteren <b>genau</b> 10 min Extinktion <b>E<sub>3</sub></b> ablesen.                            |           |                   |

Der (Carrez-)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. Gesamtkonzentration Nitrat

$$\Delta E_{\text{RLW oder CRLW}} = (E_1 \times df - E_2) - 2 \times (E_2 - E_3)$$

$$\Delta E_{\text{Probe oder Kontrolle}} = (E_1 \times df - E_2) - 2 \times (E_2 - E_3)$$

$$\Delta E_{\text{Nitrat}} = \Delta E_{\text{Probe oder Kontrolle}} - \Delta E_{\text{RLW oder CRLW}}$$

df: Dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)

RLW: Reagenzleerwert

CRLW: Carrez-Reagenzleerwert

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

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 Reagenzvolamina 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 (Carrez-)Reagenzleerwert ist dem veränderten Probenvolumen anzupassen.

$$C_{\text{Nitrat}} [\text{g/L}] = \frac{(V \times \text{MG} \times \Delta E)}{(\epsilon \times d \times v \times 1000)} = 0,2559 \times \Delta E \times F$$

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

|     |  |                    |
|-----|--|--------------------|
| V:  | Testvolumen (Basisapplikation) [mL]        | = 2,600            |
| MG: | Molekulargewicht [g/mol]                   | = 62,0             |
| d:  | Schichtdicke [cm]                          | = 1,00             |
| v:  | Probenvolumen (Basisapplikation) [mL]      | = 0,100            |
| ε:  | Extinktionskoeffizient NADPH [L/mmol x cm] | = 6,3 (bei 340 nm) |

## 5.2. Berechnung bei Feststoffen

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

## 5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Die Wiederfindung von wässrigen Kontrolllösungen sollte innerhalb  $100 \pm 5 \%$  liegen. Wir empfehlen dazu die Verwendung von Referenzmaterialien oder Standardlösungen, wie zum Beispiel:

- NIST SRM 3185 Aqueous solution
- NIST 1546a Meat homogenate
- LGC 7114 Kale powder

## 6. Leistungsdaten

### 6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Die Nitratreduktase ist spezifisch für Nitrat. Es wurden keine nebenaktiven Substanzen identifiziert.

### 6.2. Interferenzen

Sulfit und Natriumchlorid stören nicht bei oder unter 7,5 g/L. Weder eine hohe Zitronensäurekonzentration von 10 g/L, noch 3 g/L Ascorbinsäure stören bei diesem Test. Ein bekannter Störfaktor für die Nitratreduktase sind Mangan(II)-Ionen. Die Mangankonzentration in Lebensmitteln beträgt maximal 10 mg/kg in Austern und Miesmuscheln. Es gilt als gesichert, dass diese Konzentrationen die Nitratmessung aufgrund des Verdünnungsfaktors nach der Extraktion in keiner Weise stören.

### 6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Die Linearität ist bis zu 500 mg/L Nitrat gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 10 und 300 mg/L liegt (Probenvolumen 100 µL).

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung bestimmt. Daraus ergibt sich eine LoD von 7 mg/L respektive 0,8 mg/L Nitrat für ein Probenvolumen von 100 µL bzw. 500 µL. Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde anhand des Präzisionsprofils bestimmt und bestätigt eine Konzentration von 10 mg/L respektive 1,5 mg/L für 100 µL bzw. 500 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.