

Enzymatischer UV-Test zur Bestimmung von Nitrat (NO₃⁻) in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
Test-Kombination für 50 Bestimmungen

Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

Dieser Test wurde mit den folgenden Matrices getestet: Fleisch- und Fischprodukte, Gemüsepürees, -säfte und -pulver (Grünkohl, Spinat, Salat, Rucola, Karotten) sowie Wasser, Wein, Bier und Milch.

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.

Enzytec™ Liquid Nitrate E8370 kann für die colorimetrische Bestimmung von Nitrat und Nitrit in Fleisch und Fleischerzeugnissen (Armeth-Methode) verwendet werden. Hierzu ist eine separate Applikation erhältlich (siehe Kapitel 7. Unterstützende Dokumente).

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.

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.
- 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.
- Stark gefärbte Probelösungen ggf. mit PVPP entfärben:
 - 1 g PVPP + mindestens 10 mL Probelösung
 - 10 min bei RT inkubieren und auf Rollmischer invertieren, bei 4000 rpm für 5 min zentrifugieren
 - Überstand abnehmen und über Faltenfilter filtrieren
- Zur Klärung von proteinhaltigen Proben wird die Carrez-Klärung empfohlen.
- **Wichtig:** 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. 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.
- **Verdünnte** Carrez-Lösungen:
 - Carrez-I: 36 g/L Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat
 - Carrez-II: 72 g/L Zinksulfat-Heptahydrat
- **Konzentrierte** Carrez-Lösungen:
 - Carrez-I: 150 g/L Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat
 - Carrez-II: 300 g/L Zinksulfat-Heptahydrat

3.1. Trink- und Mineralwasser

- Filtrieren, vortexen oder kurz in einem Ultraschallwasserbad behandeln, wenn das Wasser Kohlendioxid enthält.
- Unverdünnt einsetzen. Probenvolumen: 500 µL bis 1000 µL

3.2. Bier

- Filtrieren, vortexen oder kurz in einem Ultraschallwasserbad behandeln, wenn das Bier Kohlendioxid enthält.
- 0,1 g Bentonit in 10 mL CO₂-freies Bier hinzugeben, anschließend vortexen oder schütteln.
- Durch einen Spritzenfilter filtrieren.
- Probenvolumen: mindestens 200 µL

3.3. Wein

- Den Wein mit 1 M NaOH neutralisieren.
- Rotwein: 1 g PVPP zu 20 mL Wein geben, 5 Minuten lang automatisch schütteln und durch einen Spritzenfilter filtrieren.
- Weißwein: direkt verwenden oder vor Gebrauch filtrieren, wenn er trüb ist.
- Probenvolumen: mindestens 200 µL

3.4. Obst- und Gemüsesäfte

- Ca. 15 g Saftprobe in einem Becherglas oder einem 50-mL Zentrifugenröhrchen **genau** einwiegen.
- 20 mL dest. Wasser hinzugeben und mischen.
- Je 5 mL **verdünnte** Carrez-I und Carrez-II-Lösung nacheinander hinzufügen und mischen.
- Mit 1 M NaOH auf pH 8,0 ± 0,1 einstellen.
- In einen 100-mL Messkolben überführen, mit dest. Wasser bis zur Marke auffüllen und mischen.
- Überstand über Falten- oder, falls nötig, Spritzenfilter filtrieren.
- Empfohlenes Probenvolumen: 100 µL für Gemüsesaft und 500 µL für Fruchtsaft.

3.5. Obst- und Gemüse

- Die Proben sorgfältig homogenisieren und ca. 2,5 g in ein 50-mL Becherglas **genau** einwiegen.
- Mit 30 mL 70 °C heißem dest. Wasser versetzen und mischen.
- Für 15 min im 60 - 70 °C warmen Wasserbad inkubieren.
- Je 2,5 mL **verdünnte** Carrez-I und Carrez-II-Lösung nacheinander hinzufügen und mischen. Im Anschluss auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
- Mit 1 M NaOH auf pH 8,0 ± 0,1 einstellen.
- In einen 50-mL Messkolben überführen, mit dest. Wasser bis zur Marke auffüllen und mischen.
- Überstand über Falten- oder, falls nötig, Spritzenfilter filtrieren.
- Empfohlenes Probenvolumen: 100 µL für Gemüse und 500 µL für Früchte

3.6. Säuglingsnahrung

- Ca. 2,5 g in ein 50-mL Becherglas **genau** einwiegen.
- Mit 25 mL siedendem dest. Wasser versetzen und mischen.
- Für 15 min in einem siedenden Wasserbad inkubieren, im Anschluss auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
- Je 2,5 mL **konzentrierte** Carrez-I und Carrez-II-Lösung nacheinander hinzufügen und mischen.
- Mit 1 M NaOH auf pH 8,0 ± 0,1 einstellen.
- In einen 50-mL Messkolben überführen, mit dest. Wasser bis zur Marke auffüllen und mischen.
- Zur Fettabscheidung den Kolben für 20 min in einen Kühlschrank bei 2 bis 8 °C stellen.
- Überstand über Falten- oder, falls nötig, Spritzenfilter filtrieren.

3.7. Fleisch, Fisch und Milchprodukte (proteinhaltige Proben, angelehnt an die Aufarbeitung von Fleisch- und Wurstwaren zur Bestimmung von Nitrat/Nitrit nach Arneht)

- Die Proben sorgfältig homogenisieren und ca. 5 g in ein 100-mL Becherglas **genau** einwiegen.
- 20 mL dest. Wasser hinzugeben und Probe suspendieren.
- Mit 30 mL siedendem dest. Wasser versetzen und mischen.
- Für 15 min in einem siedenden Wasserbad inkubieren, im Anschluss auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
- Je 3 mL **konzentrierte** Carrez-I und Carrez-II-Lösung nacheinander hinzufügen und mischen.
- Mit 1 M NaOH auf pH 8,0 ± 0,1 einstellen.
- In einen 100-mL Messkolben überführen, mit dest. Wasser bis zur Marke auffüllen und mischen.
- Zur Fettabscheidung den Kolben für 20 min in einen Kühlschrank bei 2 bis 8 °C stellen.
- Überstand über Falten- oder, falls nötig, Spritzenfilter filtrieren.

4. Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
 Temperatur: 20 - 25 °C bzw. 25 - 37 °C
 Photometer-Abgleich: gegen Luft (ohne Küvette)
 Messbereich: 30 - 300 mg/L

	RL / CRLW	Probe / Kontrolle
Reagenz 1	2000 µL	2000 µL
Probe / Kontrolle	-	100 µL
Dest. Wasser	100 µL	-
Mischen, für 3 min bei 20 - 25 °C oder 25 - 37 °C inkubieren. Extinktion E ₁ bei 340 nm messen , dann Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µL	500 µL
Mischen, bei 20 - 25 °C genau 40 min bzw. bei 25 - 37 °C genau 20 min inkubieren und anschließend Extinktion E ₂ messen .		
Inkubieren und nach weiteren genau 20 min bei 20 - 25 °C bzw. nach weiteren genau 10 min bei 25 - 37 °C Extinktion E ₃ ablesen .		

4.1. Hinweise zur Testdurchführung

- Für die Zugabe von Reagenz 1 und 2 wird die Verwendung einer Multistepper-Pipette empfohlen. Verwenden Sie für jede Komponente eine separate Spitze.
- Der (Carrez-)Reagenzleerwert **muss bei jedem Lauf einmalig** mitbestimmt und von **jedem** Probenergebnis abgezogen werden.
- Aufgrund der Schleichreaktion **muss** nach der zweiten **eine dritte** Absorptions-Messung **nach weiteren genau 20 Minuten** (20 - 25 °C) bzw. **nach weiteren genau 10 Minuten** (25 - 37 °C) durchgeführt werden. Die OD-Differenz wird zur Schleichkorrektur verwendet.

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probelösungen

5.1.1. Gesamtkonzentration Nitrat

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

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

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)
 RLW: Reagenzleerwert
 CRLW: Carrez-Reagenzleerwert

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

Der angegebene df-Wert von 0,808 **gilt für eine Basisapplikation von 100 µL**. Eine Erhöhung des Probenvolumens ist möglich (max. 1000 µL; siehe Validierungsbericht). **Bei gleichbleibenden Reagenzvolumina** 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.**

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

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: Probevolumen (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 ± 5 % liegen. Wir empfehlen dazu die Verwendung von zertifizierten Referenzmaterialien oder Standardlösungen, wie zum Beispiel:

- NIST SRM 3185 Aqueous solution
- NIST 1546a Meat homogenate
- LGC 7114 Kale powder
- FAPAS Quality Control Material:
 - Nitrate in Lettuce Puree; T15163QC
 - Nitrate in Spinach Puree; T15166QCsale
 - Nitrate in Meat; T15167QC

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Die Nitratreduktase ist spezifisch für Nitrat (NO_3^-). Für keine der bei der Validierung dieses Tests untersuchten Substanzen, konnten Nebenaktivitäten identifiziert werden (bitte beachten Sie hierzu auch den Validierungsbericht).

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 300 mg/L Nitrat gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 30 und 300 mg/L liegt.

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.

Zur Bestimmung von Konzentrationen < 30 mg/L (v.a. bei Matrixproben) sollte das Probenvolumen auf 200, 500 oder 1000 μL erhöht werden.

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Recommendation: Colorimetrische Bestimmung von Nitrat und Nitrit in Fleisch und Fleischerzeugnissen nach Armeth unter Verwendung von Enzytec™ Liquid Nitrate (E8370)
- Enzytec™ Liquid Nitrate Validierungsbericht
- Enzytec™ Liquid Nitrate Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid Nitrate Excel-Auswertevorlagen
- Enzytec™ Liquid Nitrate 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.