

UV-Test zur Bestimmung von Ameisensäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
Test-Kombination für 25 Bestimmungen

Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 – 8 °C

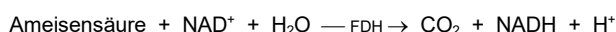
Dieser Test wurde mit ausgewählten Proben der folgenden Matrices validiert: Wein, Essig, Sauerkraut, Fruchtsäfte, Honig, Marmelade und Tomatenmark.

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

Ameisensäure (Formiat) wird durch Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) in Gegenwart von Formiat-Dehydrogenase (FDH) quantitativ zu Bicarbonat (CO₂) oxidiert:



NAD wird dabei zu NADH reduziert. Der Anstieg von NADH wird aufgrund seiner Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Das Ergebnis wird als Ameisensäure in g/l ausgegeben.

2. Reagenzien

2.1. Inhalt & Zusammensetzung

Der Test ist für eine manuelle und automatisierte Abarbeitung geeignet. Die Reagenzien reichen bei manueller Abarbeitung für 25 Bestimmungen. Die Anzahl der Bestimmungen bei automatisierter Abarbeitung ist um ein Vielfaches erhöht, jedoch Geräte-abhängig.

- Reagenz 1: 1 x 50 ml mit Puffer, FDH
- 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.
- Flüssige, klare, farblose und annähernd neutrale Probelösungen direkt im Test einsetzen oder ausreichend verdünnen, um eine Ameisensäure-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 und lassen 15 Minuten lang inkubieren. Falls erforderlich, die Messung mit einer Blindprobe vergleichen.
- Stark gefärbte Proben mit Aktivkohle oder PVPP behandeln (z.B. 2 g/100 ml) 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 entgasen, z.B. durch Rühren in einem Becherglas, kurzen Ultraschallimpuls, Filtern oder Zentrifugieren.
- Feste und halbfeste Proben zerkleinern und homogenisieren. Eine ausreichende Probenmenge in einen Messkolben einwiegen (Messbereich beachten) und mit Wasser extrahieren. Bis zur Marke auffüllen, durch Falten- oder Spritzenfilter filtrieren oder zentrifugieren. Bei Bedarf Carrez-Klärung anwenden.
- Bei fetthaltigen Proben eine ausreichende Menge (unter Berücksichtigung des Messbereichs) in einen Messkolben einwiegen und mit heißem Wasser extrahieren. Abkühlen lassen, damit sich das Fett absetzen kann, bis zur Marke auffüllen, den Messkolben 15 Minuten lang in ein Eisbad stellen und filtrieren.
- Proteinhaltige Proben mit Perchlorsäure oder Trichloressigsäure deproteinisieren.
- Alternativ, protein- und fetthaltige Proben mit Carrez-Reagenzien klären: Geeignete Probenmenge in einen 100 ml Messkolben genau einwiegen und ca. 60 ml destilliertes Wasser hinzufügen. Flüssige Proben in einen 100-ml-Messkolben oder ein Becherglas pipettieren, der/das zuvor mit 60 ml destilliertem Wasser gefüllt wurde. 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g Kalium-hexacyanoferrat(II)-Trihydrat K₄[Fe(CN)₆] x 3 H₂O/100 ml) und 5 ml Carrez-II-Lösung (7,20 g Zinksulfat ZnSO₄ x 7 H₂O/100 ml) zugeben. Nach jeder Zugabe gut mischen. Den pH-Wert mit 0,1 M NaOH auf einen Wert zwischen 7,5 und 8,5 einstellen. Die Lösung in einen 100-ml-Messkolben geben, bis zur Marke auffüllen, mischen und durch geriffelten Papierfiltern oder Spritzenfiltern filtrieren.

3.2. Bestimmung von Ameisensäure in Tomatenmark oder Tomatenketchup (§ 64, Methode 26.11.03-15)

- 10 g ± 0,010 g der Probe in einen Becher (150 ml) einwiegen und 50 ml destilliertes Wasser hinzufügen.
- 10 Minuten lang auf einem Magnetrührer homogenisieren. Die Suspension quantitativ in einen Messkolben (100 ml) überführen, bis zur Marke mit destilliertem Wasser auffüllen und mischen.
- 10 ml dieser Suspension in einen Messkolben (50 ml) überführen und bis zur Marke mit destilliertem Wasser auffüllen.
- Die Suspension durch einen Faltenfilter in einen Kolben filtrieren und dabei die ersten 15 ml verwerfen. Optional kann die Suspension auch zentrifugiert werden.
- 500 µl der erhaltenen Lösung für den Test verwenden.

3.3. Bestimmung von Ameisensäure in Mixed Pickles

- Die flüssige von der festen Phase trennen, z. B. durch Filtration.
- Zur Fettabscheidung, die Probe für 30 Minuten in den Kühlschrank oder 20 Minuten lang in ein Eisbad stellen, anschließend filtrieren und gegebenenfalls verdünnen.

3.4. Bestimmung von Ameisensäure in Fruchtsäften

- Leicht gefärbte Fruchtsäfte direkt oder mit destilliertem Wasser verdünnt im Test verwenden.
- Bei der Analyse stark gefärbter Fruchtsäfte werden 100 mg Aktivkohle oder PVPP zu 5 ml Saft hinzugefügt.
- 1 Minute lang mischen und durch einen sterilen Spritzenfilter (0,22 µm) filtrieren.
- Stark saure Säfte mit NaOH oder KOH (1 M oder 5 M) auf einen pH-Wert von 7 – 8 einstellen.

Hinweis: Säfte, die nach der Aufbereitung keine klare Lösung bilden, können zu größeren Schwankungen oder Abweichungen bei der Bestimmung führen, z.B. Orangensaft.

3.5. Bestimmung von Ameisensäure in Wein

- Weinproben sollten genauso behandelt werden wie Fruchtsäfte.
- Bei der Analyse von Rotwein 100 mg Aktivkohle zu 5 ml Probe geben, 1 Minute lang mischen und durch einen sterilen Spritzenfilter (0,22 µm) filtern.
- 200 µl der Probe im Test einsetzen.

3.6. Bestimmung von Ameisensäure in Essig

- Die Proben mit NaOH oder KOH (1 M oder 5 M) auf pH 7 – 8 neutralisieren und mit destilliertem Wasser 1:1 verdünnen.
- 200 µl der Probe im Test einsetzen.

3.7. Bestimmung von Ameisensäure in Marmelade

- 20 g einer homogenisierten Probe in einen 100-mL-Messkolben einwiegen, 20 ml heißes (60 °C) destilliertes Wasser hinzugeben.
- Anschließend 2 ml Carrez-I-Lösung (15 g Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$ ml) und 2 ml Carrez-II-Lösung (30 g Zinksulfat $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$ ml) in den Messkolben geben.
- Mit etwa 3 ml NaOH (1 M) auf ca. pH 7,5 – 8,5 einstellen. Nach jeder Zugabe mischen. Bis zur Marke mit destilliertem Wasser auffüllen, nochmals mischen und filtrieren.
- 500 µl des Filtrats für die Bestimmung verwenden.

4. Manuelle Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
 Temperatur (Messung): 20 – 37 °C
 Photometer-Abgleich: gegen Luft (ohne Küvette)
 Messbereich: 5 – 400 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 E₁ messen, dann Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, 40 Minuten bei 20 – 37 °C inkubieren und Extinktion E₂ messen.		

Wichtige Hinweise zur Testdurchführung

- Der Reagenzleerwert (Wasserprobe) **muss in jeder Messserie** mitbestimmt und von **jedem** Probenergebnis abgezogen werden.
- Die angegebenen Inkubationszeiten wurden bei 37 °C validiert und festgelegt. Die Durchführung des Tests ist grundsätzlich auch im Temperaturbereich von **20 – 37 °C** möglich.
- Bei einer Ameisensäurekonzentration unter 50 mg/l ist das Probenvolumen auf 200 µl zu erhöhen; gleiches gilt in diesem Fall für den Reagenzleerwert.
- 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 Multistep-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 Ameisensäure 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 (Reagenzverdünungsfaktor)
 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 Reagenzverdünungsfaktors (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 Ameisensäure-Konzentration erfolgt unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

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

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

V: Testvolumen Basisapplikation [ml] = 2,600
 MG: Molekulargewicht Ameisensäure [g/mol] = 46,03
 d: Schichtdicke [cm] = 1,00
 v: Probenvolumen [ml] = 0,100
 ε: Extinktionskoeffizient NADH [l/mmol x cm] = 6,3 (bei 340 nm)

5.2. Gehalt von Ameisensäure 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:

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir den Enzytec™ Liquid Multi-Acid Standard low (Art. Nr. E8470; mit 0,250 g/l Ameisensäure).

Die Wiederfindung dieses Standards sowie anderer wässriger Kontrolllösungen sollte bei $100 \pm 5 \%$ liegen, bei extrahierten Lebensmittelpollen innerhalb $90 - 110 \%$.

Hinweis: Es wird empfohlen, die Proben nach dem Öffnen bzw. nach der Extraktion umgehend im Test einzusetzen und zu messen. Bei der Analyse der Reinsubstanz Ameisensäure sind Ergebnisse von weniger als 100 % zu erwarten, da sich reine Säure allmählich in CO und Wasser zersetzt. (Bei der Herstellung der Ameisensäurelösung muss die Flüchtigkeit der Ameisensäure berücksichtigt werden).

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Die Ameisensäure-Dehydrogenase ist spezifisch für Ameisensäure. Andere Carbonsäuren wie Essigsäure, Oxalsäure, Ascorbinsäure, Citronensäure, D- und L-Milchsäure, D- und L-Äpfelsäure, Gluconsäure, Glykolsäure, Propionsäure und Weinsäure reagierten nicht.

6.2. Interferenzen

Formaldehyd und Histamin stören bis zu einer Konzentration von 10 g/l sowie Wasserstoffperoxid und Ascorbinsäure bis 5 g/l nicht. Bei Natriumsulfit ist eine niedrigere Wiederfindung ab einer Konzentration von 1,5 g/l zu erwarten.

Bei Natriumsulfit ist bei einer Konzentration von etwa 0,8 g/l mit einem leicht verzögerten Erreichen des Endpunkts der Reaktion zu rechnen; höhere Konzentrationen können innerhalb der angegebenen Inkubationszeit zu geringeren Wiederfindungen führen.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Linearität ist bis 500 mg/l Ameisensäure gegeben (Probenvolumen 100 µl). Der empfohlene Messbereich beträgt 5 – 400 mg/l.

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 1,0 mg/l und bei einem Probenvolumen von 1000 µl 0,1 mg/l.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde anhand des Präzisionsprofils bestimmt und beträgt 2,0 mg/l bzw. 0,2 mg/l Ameisensäure bei einem Probenvolumen von 100 µl respektive 1000 µl.

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ Liquid Formic acid Validierungsbericht
- Enzytec™ Liquid Formic acid Excel-Auswertevorlagen
- Enzytec™ Liquid Formic acid 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 Matrices 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 GARANTIEEN JEDLICHER 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.