

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

Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

Dieser Test wurde für die folgenden Matrices validiert: Sojasauce, Flüssig-Vollei und Pulver-Vollei, Fleischprodukte, Gemüsebrühepulver, Fruchtsäfte und Wein. Detaillierte Ergebnisse und weitere Informationen zu den Validierungsdaten finden Sie im Validierungsbericht.

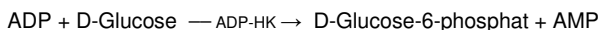
Andere Lebensmittel oder Probenmaterialien können getestet werden und müssen vom Anwender validiert werden.

1. Testprinzip

Bernsteinsäure (Succinat) wird in Gegenwart des Enzyms Succinyl-CoA-Synthetase (SCS) durch Adenosin-triphosphat (ATP) und Coenzym A (CoA) zu Succinyl-CoA umgesetzt:



Das entstehende Adenosin-diphosphat (ADP) reagiert mit D-Glucose bei Anwesenheit einer ADP-abhängigen Hexokinase (ADP-HK), wobei D-Glucose zu D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) phosphoryliert wird und gleichzeitig Adenosin-monophosphat (AMP) entsteht:



In Gegenwart einer Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) wird D-Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphoglucono-δ-lacton oxidiert:



Die Menge des bei dieser Reaktion gebildeten NADH ist stöchiometrisch zur Menge der Bernsteinsäure. NADH wird auf der Grundlage seiner spezifischen Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

2. Reagenzien

2.1. Inhalt & Zusammensetzung

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

Die Inkubationszeiten bei automatisierter Abarbeitung können ggf. abweichen und müssen daher verifiziert werden.

- Reagenz 1 1 x 50 ml Puffer, NAD
- Reagenz 2 1 x 12,5 ml Puffer, SCS, ADP-HK, G6P-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

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

3.1. Allgemein

- 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 mittels Falten- und ggf. Spritzenfilter filtrieren.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen, z.B. durch Filtrieren oder Zentrifugieren.
- Stark gefärbte und hochkonzentrierte Proben sollten mit Polyvinylpyrrolidon (PVPP) entfärbt werden.
- Proteinhaltige Proben mit Perchlorsäure klären.
- 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.
- Feste und halbfeste Proben ausreichend homogenisieren und zerkleinern; mit Wasser extrahieren oder in dest. Wasser auflösen und ggf. filtern.
- Stark saure Proben durch Zugabe von Natrium- oder Kaliumhydroxidlösung auf ca. pH 8,0 einstellen.

• Kozentrierte Carrez-Lösungen:

- Carrez-I: 155 g/l Kalium-hexacyanoferrat (II) Trihydrat
- Carrez-II: 300 g/l Zinksulfat Heptahydrat

• Verdünnte Carrez-Lösungen:

- Carrez-I: 36 g/l Kalium-hexacyanoferrat (II) Trihydrat
- Carrez-II: 72 g/l Zinksulfat Heptahydrat

3.2. Bestimmung von Bernsteinsäure in Wein

- Weißwein kann unverdünnt direkt eingesetzt werden.
- Roséwein 1:2 mit dest. Wasser verdünnen.
- Rotwein 1:4 mit dest. Wasser verdünnen.
- Falls nötig, den Ansatz (Weiß-, Rosé- oder Rotwein) zusätzlich filtrieren (Filtereinheit mit 5 µm Porengröße) und anschließend 100 µl Probelösung im Test einsetzen.

3.3. Bestimmung von Bernsteinsäure in Sojasauce

- 1 ml Sojasauce mit 2 ml verdünnter Carrez-I-Lösung versetzen und leicht schwenken.
- 2 ml verdünnte Carrez-II-Lösung hinzugeben und leicht schwenken.
- Ansatz filtrieren (Filtereinheit mit 5 µm Porengröße) und 100 µl Probelösung im Test einsetzen.

3.4. Bestimmung von Bernsteinsäure in Fruchtsäften

- Farblose Fruchtsäfte können direkt eingesetzt werden.
- Gefärbte Säfte mit PVPP entfärben. Anschließend 100 µl Probelösung im Test einsetzen.

3.5. Bestimmung von Bernsteinsäure in Flüssig-Vollei

- 5 g homogenisiertes Vollei in einen 25 ml Messkolben genau einwiegen.
- 10 ml dest. Wasser und 1 Tropfen *n*-Octanol hinzufügen, mischen und 15 Minuten in einem Wasserbad bei ca. 100 °C inkubieren.
- Kolben auf 20 - 25 °C abkühlen lassen.
- 1 ml konzentrierte Carrez-I-Lösung hinzugeben und kräftig schwenken.
- 1 ml konzentrierte Carrez-II-Lösung hinzugeben und kräftig schwenken.
- Mit 0,1 M NaOH bis zur 25 ml Marke auffüllen, mischen und über einen Faltenfilter filtrieren.
- Anschließend 100 µl Probelösung im Test einsetzen.

3.6. Bestimmung von Bernsteinsäure in Vollei-Pulver

- 1 g homogenisiertes Vollei in einen 25 ml Messkolben genau einwiegen.
- 12 ml dest. Wasser und 1 Tropfen n-Octanol hinzufügen, mischen und 15 Minuten in einem Wasserbad bei ca. 100 °C inkubieren.
- Kolben auf 20 - 25 °C abkühlen lassen.
- 1 ml konzentrierte Carrez-I-Lösung hinzugeben und kräftig schwenken.
- 1 ml konzentrierte Carrez-II-Lösung hinzugeben und kräftig schwenken.
- Mit 1 M NaOH auf pH 8 - 9 einstellen.
- Messkolben mit dest. Wasser bis zur 25 ml Marke auffüllen.
- Anschließend 100 µl Probelösung im Test einsetzen.

3.7 Bestimmung von Bernsteinsäure in Fleischprodukten

- 10 g homogenisierte Probe genau in einem 50 ml Probenröhrchen einwiegen, 20 ml dest. Wasser hinzufügen und vortexen.
- Gesamtvolumen mit dest. Wasser auf 50 ml auffüllen, verschließen, mischen und 15 Minuten in einem Wasserbad bei 70 °C inkubieren.
- Einen Tropfen konzentrierte Schwefelsäure vorsichtig hinzufügen, verschließen und erneut vortexen.
- Extrakt in einen 100 ml Messkolben überführen und auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
- Mit dest. Wasser bis zur Marke auffüllen, sodass die Fettschicht oberhalb der Marke liegt.
- Durch einen Faltenfilter filtrieren und anschließend 100 µl Probelösung im Test einsetzen.

3.8 Bestimmung von Bernsteinsäure in Gemüsebrühepulver

- 1 g homogenisierte Probe genau in einem 50 ml Probenröhrchen einwiegen, 15 ml warmes dest. Wasser hinzufügen und vortexen.
- Gesamtvolumen mit dest. Wasser auf 50 ml auffüllen, verschließen, mischen und 15 Minuten in einem Wasserbad bei 70 °C inkubieren.
- Extrakt in einen 100 ml Messkolben überführen und für 15 min auf Eis stellen.
- Mit dest. Wasser bis zur 100 ml Marke auffüllen, durch einen Faltenfilter filtrieren und 1000 µl Probelösung im Test einsetzen.

4. Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
 Temperatur: 20 - 37 °C (während der Messung)
 Photometer-Abgleich: gegen Luft (ohne Küvette)
 Messbereich: 3 - 800 mg/l (bei 100 µl Probe)

	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, 12 min bei 37 °C oder 17 min bei 20 °C inkubieren, Extinktion E ₂ messen.		

- Der Reagenzleerwert (RLW) muss bei jedem Lauf **einmalig** mitbestimmt und von jedem Probenergebnis abgezogen werden.
- Reagenzleerwert und Probe müssen **im selben Lauf** und unter gleichen Bedingungen gemessen werden.
- Zur Steigerung der Sensitivität ist eine Erhöhung des Probenvolumens bis zu 1000 µl (siehe Validierungsbericht) bei **unveränderten** Reagenzvolumina möglich.
- Das Volumen des Reagenzleerwertes ist dem veränderten Probenvolumen anzupassen.
- Bei Erhöhung des Probenvolumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es dies Matrix-abhängig zu überprüfen.

4.1. Weitere Hinweise zur Testdurchführung

- Die angegebenen Inkubationszeiten können je nach vorherrschenden Laborbedingungen und abhängig von der Pipettiergenauigkeit variieren. Es wird daher empfohlen bei den ersten Durchläufen das Ende der Reaktion abzuwarten und die Zeiten ggf. anzupassen.
- Falls die Reaktion nach der angegebenen Inkubationszeit nicht zum Stillstand gekommen ist, sollten die Extinktionen in 2-min-Abständen weiter gemessen werden, bis eine konstante Extinktionszunahme pro 2 min erreicht wird. Wurden konstante Extinktionszunahmen festgestellt, so werden die Extinktionen E₂ auf die Zeit der Zugabe von Reagenz 2 extrapoliert.
- Zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses sollten die gemessenen Extinktionsdifferenzen üblicherweise mindestens 0,050-0,100 Extinktionseinheiten betragen.
- Für die Zugabe der Reagenzien wird die Verwendung einer Multistep-Pipette empfohlen. Verwenden Sie für jede Komponente eine separate Spitze und spülen Sie die Spitze vor dem Pipettieren.
- Zur Durchmischung empfiehlt sich die Verwendung von Rührspateln für jede einzelne Küvette. Diesen erst unmittelbar vor den Extinktionsmessungen aus der Küvette nehmen.
- Ist die gemessene Extinktionsdifferenz zu klein (z. B. ΔE < 0,02), so ist das Probenvolumen (v) bis auf maximal 1000 µl zu erhöhen oder die Probelösung erneut herzustellen (höhere Einwaage oder weniger starke Verdünnung). Das Volumen der Wassermenge des Reagenzleerwertes ist in diesem Fall entsprechend anzupassen, so dass in allen das gleiche Testvolumen vorliegt. Das geänderte Probenvolumen ist in den Berechnungsformeln entsprechend einzusetzen.

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probelösungen

5.1.1. Gesamtkonzentration Bernsteinsäure

Es gilt die Extinktionsdifferenz ΔE für jede Probe zu berechnen:

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)
 RLW: 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. **Die Erhöhung des Probenvolumens erfordert die Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors (df).**

Die Berechnung der Bernsteinsäure-Konzentration erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$C_{\text{Bernsteinsäure}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(\epsilon \times d \times v \times 1000)} = 0,4874 \times \Delta E (\times F)$$

V: Testvolumen Basisapplikation [ml] = 2,6
 MG: Molekulargewicht Bernsteinsäure [g/mol] = 118,09
 d: Schichtdicke [cm] = 1,0
 v: Probevolumen (Basisapplikation) [ml] = 0,1
 ε: Extinktionskoeffizient NADH [l/(mmol x cm)] = 6,3 (bei 340 nm)

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

5.2. 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:

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

Beispiel:

$C_{\text{Bernsteinsäure}} = 0,454 \text{ g/l}$ Einwaage = 5,02 g/100 ml $\pm 50,2 \text{ g/l}$

$$\text{Gehalt}_{\text{Bernsteinsäure}} = \frac{0,454 \text{ g/l}}{50,2 \text{ g/l}} \times 100 = 0,904 \text{ g/100 g (oder \%)}$$

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Die Wiederfindung von Kontrolllösungen sollte innerhalb 100 \pm 5 % liegen.

Wir empfehlen dazu die Verwendung von Referenzmaterialien oder Standardlösungen, wie zum Beispiel:

- Enzytec™ Liquid Multi-acid Standard 2 low (E8470) mit 0,25 g/l Bernsteinsäure direkt als Kontrolle einzusetzen

6. Leistungsdaten**6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten**

Die Succinyl-CoA-Synthetase ist spezifisch für Bernsteinsäure. Für Itaconsäure und D-/L-Äpfelsäure konnten geringe Nebenaktivitäten oberhalb des LoQ des Tests identifiziert werden. Diese Aktivitäten zeigen sich in einer Schleichreaktion, die jedoch rechnerisch eliminiert werden kann (siehe Validierungsbericht).

6.2. Interferenzen

Für Glycerin, Saccharose, D-Fructose, D-Glucose, Citronensäure, L-Ascorbinsäure, 2-Oxoglutarinsäure, L-Weinsäure, Malonsäure und NaCl konnten keine Interferenzen bei Lebensmittel üblichen Konzentrationen identifiziert werden.

Oxalsäure zeigt bei 25 g/l eine geringe Interferenz, die bei 3,13 g/l nicht mehr vorhanden ist. D-/L-Äpfelsäure und Sulfite zeigen bei oder unter 0,3 g/l keine Störungen. Sulfite als redoxreaktive Substanz interferiert bei $\leq 2 \text{ g/l}$ nicht.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Bei einem Probenvolumen von 100 μl ist die Linearität bis 800 mg/l Bernsteinsäure gegeben. Der empfohlene Messbereich für 100 μl liegt bei 3 - 800 mg/l bzw. bei 0,4 - 80 mg/l für 1000 μl Probenvolumen.

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde nach der Methode DIN 32645:2008-11 in stabilisierter wässriger Lösung bestimmt. Daraus ergibt sich ein LoD von 1 mg/l Bernsteinsäure für ein Probenvolumen von 100 μl und 0,1 mg/l für 1000 μl Probenvolumen.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde anhand eines Präzisionsprofils bestimmt und bestätigt eine Konzentration von 3 mg/l für 100 μl und 0,4 mg/l für 1000 μl Probenvolumen.

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ Liquid Validierungsberichte
- Enzytec™ Liquid Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid Excel-Auswertevorlagen
- Enzytec™ Liquid Technische Informationen
- 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.