

Colorimetrischer Test zur Bestimmung von Gesamtsulfit in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
Test-Kombination für 100 Bestimmungen

Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 – 8 °C

Dieser Test wurde mit ausgewählten Proben der folgenden Matrices validiert: Wein.

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

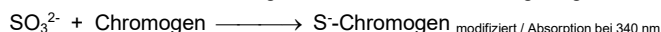
Der Test kann auch mit anderen Lebensmitteln oder Probenmaterialien verwendet werden, sofern diese einer individuellen Validierung durch den Anwender unterzogen werden.

1. Testprinzip

Der Sulfitgehalt (SO₂) wird bei einem pH-Wert gemessen, bei dem das gesamte Sulfit von seinen Bindungspartnern (z.B. Acetaldehyd und Zucker) freigesetzt wird und mit einem spezifischen Farbreagenz (Chromogen) reagiert. Bei diesem bestimmten pH-Wert reagiert das Chromogen mit dem Sulfitanion SO₃²⁻.

Die Menge des reagierten Chromogens ist direkt proportional zur Sulfitkonzentration in der Probe und wird aufgrund seiner Absorption bei 340 nm gemessen.

Die Reaktion wird durch folgende chemische Gleichung dargestellt:



2. Reagenzien

2.1. Inhalt & Zusammensetzung

Der Test ist für eine manuelle und automatisierte Abarbeitung geeignet. Die Reagenzien reichen bei manueller Abarbeitung für 100 Bestimmungen. Die Testanzahl bei automatisierter Abarbeitung ist um ein Vielfaches erhöht, jedoch geräteabhängig.

- Reagenz 1: 2 x 100 ml mit Puffer
- Reagenz 2: 2 x 25 ml mit Chromogen
- Kalibrator: 1 x 3,5 ml mit 150 mg/l SO₂-Äquivalent

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

- Die Probenvorbereitung für die manuelle und die automatisierte Testdurchführung ist identisch.
- Probenlösungen vor der Messung auf Raumtemperatur bringen.
- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration im Messbereich (siehe Leistungsdaten) einsetzen.

- Verdünnung der Proben, Kalibratoren, Kontrollen: nur **frisches** destilliertes Wasser verwenden, um SO₂-Oxidation zu vermeiden.
- Trübe Proben (z. B. Sauerkrautsaft, Ananassaft): die Testlösung durch einen geriffelten Papier- oder Spritzenfilter filtrieren oder in einem Reaktionsröhrchen zentrifugieren (z.B. 3000 U/min für mindestens 5 Minuten). 100 µl (bei Bedarf mehr) des klaren Filtrats / Überstands im Test einsetzen (Fruchtsäfte unverdünnt; fermentierte Gemüsesäfte vor der Messung ggf. verdünnen).
- Stark gefärbte Proben (wie z.B. Wein und Säfte) ggf. mit Polyvinylpyrrolidon (PVPP, z.B. 1 g auf 100 ml Probe) entfärben. Die Probe 1 Minute rühren oder schütteln. Filtrieren oder zentrifugieren (s.o.), bis ein klarer Überstand entsteht.
- Kohlendioxidhaltige Proben (z.B. Bier), durch kurzen Ultraschallimpuls bei 0 °C für ca. 10 Sekunden entgasen (Ultraschallbad, gefüllt mit eiskaltem Wasser und Eiswürfeln); die Probe ggf. filtrieren, bis der Extrakt klar ist und anschließend 100 µl im Test einsetzen.
- Wichtig:** eine Carrez-Klärung kann bei der Probenvorbereitung für die Sulfitbestimmung nicht angewendet werden.

4. Manuelle Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
Temperatur (Messung): 20 – 37 °C
Photometer-Abgleich: gegen Luft (ohne Küvette)
Messbereich: 3 – 300 mg/l (Gesamt-SO₂)

	Reagenz-leerwert	Kalibrator	Probe / Kontrolle
Reagenz 1	2000 µl	2000 µl	2000 µl
Kalibrator	-	100 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	500 µl
Mischen, 5 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 25 °C validiert und festgelegt. Die Durchführung des Tests ist grundsätzlich auch im Temperaturbereich von **20 – 37 °C** möglich.
- SO₂ ist flüchtig, reaktiv und leicht durch Luftsauerstoff oxidierbar, wodurch Verluste entstehen können. Diese Eigenschaften müssen bei der Probenvorbereitung, der Testdurchführung und beim Vergleich mit alternativen Methoden berücksichtigt werden.
- Ohne Destillation kann die iodometrische Titration neben SO₂ auch andere reduzierende Substanzen erfassen, während die colorimetrische Methode spezifischer für SO₂ ist. Daher sind niedrigere Ergebnisse mit dieser colorimetrischen Methode im Vergleich zur Titration zu erwarten.
- 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 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.
- 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 Gesamtsulfit in Probelösungen

Es gilt die Extinktionsdifferenz ΔE für jede Probe zu berechnen:

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünungsfaktor)
RLW: Reagenzleerwert

$$df = \frac{\text{Probenvolumen [ml]} + \text{Volumen R1 [ml]}}{\text{Reaktionsvolumen [ml]}} = 0,808$$

Der angegebene df-Wert von **0,808** gilt für eine Basisapplikation von 100 µl. Eine Erhöhung des Probenvolumens ist möglich (max. 1000 µl). 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.

Der Test verwendet einen methodenspezifischen Kalibrator bekannter Konzentration, der **ausschließlich** für diesen Test vorgesehen ist.

Die Konzentration der Probe wird anhand ihrer optischen Dichte im Verhältnis zur optischen Dichte des Kalibrators berechnet:

$$C_{\text{Probe}} [\text{g/l}] = \frac{C_{\text{Kalibrator}} [\text{g/l}]}{\Delta E_{\text{Kalibrator}}} \times \Delta E_{\text{Probe}}$$

Da die Konzentration des Kalibrators auf 150 mg/l eingestellt ist, ergibt sich daraus die nachstehende Berechnungsformel:

$$C_{\text{Probe}} [\text{mg/l}] = 150 \text{ mg/L} \times \frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Kalibrator}}} \times F$$

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

5.2. Gehalt von Gesamtsulfit in Feststoffen

Bei der Analyse fester und halbfester Proben, die für die Extraktion der Probe eingewogen werden müssen, wird der Gehalt auf die Einwaage bezogen:

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir eine angesetzte Lösung aus einem Sulfit Salz. Da eine solche Lösung im Gegensatz zum mitgelieferten Kalibrator nicht stabilisiert ist, muss diese **jeden Tag frisch angesetzt** werden (keine Glasröhrchen, sondern Plastikröhrchen verwenden). Die entsprechende Sulfitkonzentration muss je nach Molekulargewicht des eingesetzten Salzes berechnet werden.

Natriumthiosulfat ist als gebrauchsfertige Lösung kommerziell erhältlich.

Die Wiederfindung von wässrigen Sulfitkontrolllösungen sollte bei 100 ± 5 % liegen.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Der Test ist spezifisch für SO₂ bzw. das Sulfit-Anion SO₃²⁻. Nebenaktivitäten konnten nicht ermittelt werden.

6.2. Interferenzen

Interferenzen wurden sowohl mit thiolhaltigen als auch mit thiolreaktiven Verbindungen festgestellt.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Obwohl der Kalibrator einen Gehalt von 150 mg/l aufweist, ist der Test bis 300 mg/l linear, sodass die Ergebnisse bis zu dieser Konzentration extrapoliert werden können.

Der empfohlene Messbereich beträgt 3 – 300 mg/l für ein Probenvolumen von 100 µl.

Beispiel von Ergebnissen

SO ₂ (mg/l)	E ₁	E ₁ × df	E ₂	ΔE	minus Blank
0	0,050	0,040	0,108	0,067	0,000
50	0,048	0,039	0,325	0,286	0,219
Kalibrator	0,049	0,040	0,777	0,737	0,670
300	0,050	0,040	1,408	1,368	1,301

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung ermittelt. Bei einem Probenvolumen von 100 µl beträgt die berechnete LoD 1,5 mg/l.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde mittels Präzisionsprofil ermittelt. Bei einem Probenvolumen von 100 µl beträgt die berechnete Nachweisgrenze (LoQ) 3,0 mg/l.

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ Liquid SO₂-Total Validierungsbericht
- Enzytec™ Liquid SO₂-Total Excel-Auswertevorlage
- Enzytec™ Liquid SO₂-Total Technical Information
- Enzytec™ Liquid Allgemeines 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 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 & 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 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.