Colorimetrischer Test zur Bestimmung von freiem SO_2 in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
Nur für den Laborgebrauch
Test-Kombination für 100 Bestimmungen 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

Freies SO_2 wird mit einem spezifischen Farbstoff bei einem sauren pH-Wert gemessen. Bei diesem pH-Wert reagiert das Chromogen mit dem Sulfit-Anion SO_3^{2-}. Die Menge an umgesetztem Chromogen ist proportional zur Konzentration des Sulfits in der Probe und wird und aufgrund seiner Absorption bei 340 nm gemessen.

Die Reaktion kann durch die folgende chemische Gleichung dargestellt werden:

SO_3^{2-} + Chromogen $\longrightarrow$ S^--Chromogen $_{modifiziert}$

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 Anzahl der Bestimmungen 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 50 mg/l SO_2-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 Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration im Messbereich (siehe Leistungsdaten) einsetzen.
- Zur Verdünnung der Proben, Kalibratoren oder Kontrollen nur **frisches** destilliertes Wasser verwenden, um eine SO_2-Oxidation zu vermeiden.
- Trübe Proben (z. B. Sauerkrautsaft, Ananassaft): 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 oder ein klarer Überstand entsteht. Davon 100 µl (oder bei Bedarf mehr) im Test einsetzen (Fruchtsäfte unverdünnt; fermentierte Gemüsesäfte sollten vor der Messung verdünnt werden).
- Stark gefärbte Proben (wie z.B. Wein und Säfte) gegebenenfalls mit Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP, bspw. 1 g / 100 ml Probe) entfärben. Die Probe 1 Minute lang rühren oder schütteln. Im Anschluss filtern oder mindestens 5 Minuten bei 3000 U/min zentrifugieren, bis ein klarer Überstand entsteht.
- Proben, die Kohlendioxid enthalten (z. B. Bier), mit Hilfe eines kurzen Ultraschallimpulses (10 s) entgasen; ggf. filtern, wenn der Extrakt nicht klar ist und 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):	25 – 37 °C
Photometer-Abgleich:	gegen Luft (ohne Küvette)
Messbereich:	7 – 300 mg/l (freies SO_2)

	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 25 – 37 °C** inkubieren. **Extinktion E_1 messen**, dann Zugabe von:			
Reagenz 2	500 µl	500 µl	500 µl
Mischen, **10 Minuten bei 25 °C** oder **5 Minuten bei 37 °C*** inkubieren und **Extinktion E_2 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 **25 – 37 °C** möglich.
- * Bitte Kapitel 5.3 beachten
- SO_2 ist flüchtig, reaktiv und leicht durch Luftsauerstoff oxidierbar, wodurch Verluste entstehen können. Diese Eigenschaften des Analyten müssen bei der Probenvorbereitung und der Testdurchführung oder beim Vergleich von Daten aus verschiedenen Methoden berücksichtigt werden.
- Der Kalibrator wurde spezifisch für diesen Test entwickelt und darf nicht in anderen Methoden eingesetzt werden.
- 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 (< 0,01), 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 freiem SO_2 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 (Reagenzverdünnungsfaktor)
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 Reagenzverdünnungsfaktors (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 wird mithilfe eines Standards kalibriert. Die für eine Probe gemessene optische Dichte wird mit diesem Standard verglichen und ermöglicht die Berechnung der Konzentration:

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

Da die Konzentration des Kalibrators auf 50 mg/l eingestellt ist, ergibt sich daraus die nachstehende Berechnungsformel:

$$C_{\text{Probe}}\ [mg/l] = 50\ mg/L \times \frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Kalibrator}}} \times F$$

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:

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir eine angesetzte Lösung aus einem Sulfitsalz. 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.

Die Wiederfindung von *wässrigen* Sulfitkontrolllösungen sollte bei 100 ± 5 % liegen ggfs. ist die E2 Inkubationszeit auf die Laborbedingungen individuell anzupassen.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Der Test ist spezifisch für SO_2 bzw. das Sulfit-Anion SO_3^{2-}.

6.2. Interferenzen

Interferenzen wurden mit thiolhaltigen und thiolreaktiven Verbindungen festgestellt sowie auch mit Natriumnitrit.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Obwohl der Kalibrator einen Gehalt von 50 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 7 – 300 mg/l (100 µl Probe).

Beispiel von Ergebnissen

SO_2 (mg/l)	E_1	E_1 × df	E_2	ΔE	minus Blank
0	0,050	0,040	0,196	0,156	0,000
Kalibrator	0,047	0,038	0,413	0,375	0,219
150	0,050	0,040	0,885	0,845	0,689
300	0,050	0,040	1,558	1,518	1,362

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 4,0 mg/l.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde mittels Präzisionsprofil ermittelt. Bei einem Probenvolumen von 100 µl beträgt die berechnete Nachweisgrenze (LoQ) 7,0 mg/l.

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ *Liquid* SO_2-Free Validierungsbericht
- Enzytec™ *Liquid* SO_2-Free Excel-Auswertevorlage
- Enzytec™ *Liquid* SO_2-Free 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 colorimetrischen Test 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 Matrizes 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 GARANTIEN 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.