

Enzymatische Bestimmung von Ethanol in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien  
 AOAC® Official Method™ 2017.07 für Kombucha, Säfte und Alkohol-freies Bier  
 2 x 50 ml R1 + 2 x 12,5 ml R2 (50 Tests)

Nur für den Laborgebrauch

Lagerung bei 2 - 8 °C

**Testprinzip**

Enzymatische Bestimmung mit Alkohol-Dehydrogenase (ADH).  
 NADH wird gebildet und bei 340 nm gemessen:  
 Ethanol + NAD<sup>+</sup> — ADH —> Acetaldehyd + NADH + H<sup>+</sup>

**Reagenzien**

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig.  
 Reagenz 1: zwei Flaschen ≥ 50 ml (Puffer)  
 Reagenz 2: zwei Flaschen ≥ 12,5 ml (NAD, ADH)

Die Reagenzien sind bei 2 - 8 °C bis zum Monatsende der Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren. Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Chemikalien sollten beachtet werden. Nicht verschlucken! Berührung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten entnehmen Sie bitte den Sicherheitsdatenblättern (MSDS) auf unserer Internetseite (www.r-biopharm.de). Nach Gebrauch die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgen. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

**Probenvorbereitung**

- AOAC® Methode für Kombucha, Säfte und Alkohol-freies Bier: Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren und testen, ggfls. nach Verdünnung in den angegebenen Messbereich.
- Klare Probelösungen direkt, bzw. nach Verdünnen in den angegebenen Messbereich einsetzen.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Protein- und fetthaltige Proben mit Carrez-Reagenzien klären.
- Feste- und halb feste Proben zerkleinern und homogenisieren und mit Wasser extrahieren. Filtrieren oder zentrifugieren, oder bei Bedarf Carrez-Klärung anwenden

**Test Durchführung**

Wellenlänge: 340 nm  
 Schichtdicke: 1 cm  
 Temperatur: 20 – 25 °C/37 °C  
 Messung: Gegen Luft oder Wasser  
 Probe: 3 – 500 mg/l

	Reagenz-Blank (RB)	Proben
<b>Reagenz 1</b>	2000 µl	2000 µl
<b>Probe/Standard</b>	-	100 µl
<b>Bidest. Wasser</b>	100 µl	-
Mischen, 1 Min. bei 37 °C oder 3 Min. bei 20 - 25 °C inkubieren. Extinktion E <sub>1</sub> messen, dann zugeben:		
<b>Reagenz 2</b>	500 µl	500 µl
Mischen, bis zum Ende der Reaktion inkubieren (ca. 10 Min. bei 37°C oder ca. 15 Min. bei 20 - 25 °C). Extinktion E <sub>2</sub> messen.		

Der Reagenzblank muss bei jedem Lauf einmal durchgeführt werden, und von jedem Probenergebnis abgezogen werden.

Um Verdunstungsverluste zu vermeiden, muss die Probe in das vorgelegte Reagenz 1 pipettiert werden.

**Berechnung der Ergebnisse**

$$\Delta A = (E_2 - df \times E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - df \times E_1)_{\text{RB}}$$

$$df = \text{Reagenzverdünnungsfaktor (Dilution factor)}$$

$$= (\text{Probenvolumen} + R1) / (\text{Probenvolumen} + R1 + R2) = 0,808$$

$$c = (V \times MG \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \quad [\text{g/l Ethanol}]$$

$$c = (2,600 \times 46,07 \times \Delta A) / (\epsilon \times 1 \times 0,1 \times 1000)$$

Hieraus ergibt sich bei 340 nm ( $\epsilon = 6.3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ):

$$C_{\text{Ethanol}} [\text{g/l}] = 0,190 \times \Delta A$$

$$\text{Alkohol in Volumen Prozent [Vol. \%]} = C_{\text{Ethanol}} [\text{g/l}] / 7,894$$

**Hinweise**

Der Test weist eine hohe Empfindlichkeit auf. Ethanol in der Atmosphäre (z. B. durch Reinigungslösungen oder anderen Reagenzien), führt zu Schleichreaktionen und falschen Ergebnissen. Deshalb unbedingt in ethanolfreier Atmosphäre, oder mit luftdicht verschlossenen Küvetten arbeiten.

Wegen der Verdunstung von Ethanol müssen bei der Probenvorbereitung geeignete Maßnahmen getroffen werden:

- Beim Verdünnen der Probelösung, Probe immer unter die Oberfläche der Verdünnungslösung pipettieren.
- Probenvolumen soll mindestens 100 µl betragen.
- Bei der Filtration das Filtrat nicht tropfen, sondern an der Wand des Auffanggefäßes ablaufen lassen.
- Verdünnte Proben innerhalb des gleichen Tages verwenden
- Präzision ist stark von der Pipettechnik abhängig.

**Leistungsdaten**

**Spezifität**

ADH oxidiert primäre Alkohole. Die Wiederfindung von Ethanol liegt bei ca. 100%, während andere primäre Alkohole (n-Propanol und n-Butanol) eine niedrigere Wiederfindung zeigen. Sekundäre und tertiäre Alkohole können zu Schleich-Reaktionen führen.

**Linearität und Messbereich**

Linearität ist bis 500 mg/l Ethanol gegeben. Der empfohlene Messbereich liegt zwischen 20 und 300 mg/l, um einen  $\Delta A \approx 1,5$  (A) zu gewährleisten. Wird dieser Bereich überschritten, sollten die Proben auf eine Konzentration von 50 bis 300 mg/l mit Aqua dest. verdünnt werden. Der Verdünnungsfaktor ist bei der Berechnung zu berücksichtigen.

**Sensitivität**

Die untere Nachweisgrenze (LoD) und die Quantifizierungsgrenze (LoQ) wurden nach der Methode DIN 32645:2008-11 ermittelt:

- LoD = 1,9 mg/l
- LoQ = 3,3 mg/l

**Präzision und Wiederfindung**

Für Kombucha, Säfte und Alkohol-freies Bier:  
 - relative Wiederholstandardabweichung [RSD(r)] < 2%  
 - relative Vergleichstandardabweichung [RSD(R)] < 3%  
 - Wiederfindung 95 – 105 %

**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.