

Enzymatische UV-Bestimmung von Ethanol in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien  
2 x 50 mL R1 und 2 x 12,5 mL R2 – 50 Tests (manuell) / ≥ 500 Tests (Auto-Analysegerät)

Nur für den Laborgebrauch  
Lagerung bei 2 - 8 °C

**Methode**

Enzymatischer UV-Test mit Alkohol-Dehydrogenase (A-DH).  
AOAC® *Official Method*<sup>SM</sup> 2017.07 für Kombucha, Säfte und alkoholfreies Bier.

**Testprinzip**

In Gegenwart des Enzyms Alkohol-Dehydrogenase (A-DH) wird Ethanol durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) zu Acetaldehyd oxidiert. NADH wird gebildet und bei 340 nm gemessen:



**Reagenzien**

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig.

- Reagenz 1: 2 x 50 mL (Puffer)
- Reagenz 2: 2 x 12,5 mL (NAD, A-DH)

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 sind den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (MSDS) auf unserer Internetseite [www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de) zu entnehmen. Nach Gebrauch die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgen. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

**Probenvorbereitung**

- Klare und flüssige Probelösungen direkt, bzw. nach Verdünnen in den Messbereich (siehe Leistungsdaten) einsetzen.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Proteinhaltige Proben mit Carrez-Reagenzien klären.
- Feste und halbfeste Proben zerkleinern und homogenisieren und mit Wasser extrahieren (z. B. 30 min bei 60 °C). Filtrieren oder zentrifugieren, bei Bedarf Carrez-Klärung anwenden.
- Stark fetthaltige Proben mit heißem Wasser extrahieren, dann zur Fettabscheidung abkühlen lassen (Eis oder Kühlschrank). Fettschicht entfernen und wässrige Lösung filtrieren.
- Beim Verdünnen der Probelösung, die Probe immer unter die Oberfläche der Verdünnungslösung pipettieren.
- Bei der Filtration das Filtrat nicht tropfen, sondern an der Wand des Auffanggefäßes ablaufen lassen.
- Verdünnte Proben innerhalb des gleichen Tages verwenden.
- Detaillierter Probenaufarbeitungsleitfaden auf Anfrage erhältlich.

**Testdurchführung**

Wellenlänge: 340 nm  
Temperatur: 37 °C oder 20 - 25 °C  
Messung: gegen Luft oder Wasser  
Probe: 30 - 300 mg/L

	Reagenzleerwert	Probe / Kontrolle
<b>Reagenz 1</b>	2000 µL	2000 µL
<b>Probe / Kontrolle</b>	-	100 µL
<b>Dest. Wasser</b>	100 µL	-
Stets R1 vorlegen! Mischen, 3 min bei 37 °C oder 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 Reagenzleerwert muss bei jedem Lauf einmalig mitbestimmt und von jedem Probenergebnis abgezogen werden.

**Berechnung der Ergebnisse**

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

df: dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)  
RLW: Reagenzleerwert

$$df_{\text{Basisapplikation}} = \frac{\text{Probenvolumen} + R1}{\text{Testvolumen}} = 0,808$$

Eine Erhöhung des Probenvolumens (bis 1000 µL) bei unveränderten Reagenzvolumina erfordert Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors.

$$c_{\text{Ethanol}} [\text{g/L}] = \frac{(V \times \text{MG} \times \Delta E)}{(\epsilon \times d \times v \times 1000)}$$

V: Testvolumen [mL] = 2,600  
MG: Molekulargewicht [g/mol] = 46,07  
d: Schichtdicke [cm] = 1,00  
v: Probenvolumen [mL] = 0,100  
ε: Extinktionskoeffizient NADH [L/(mmol x cm)] = 6,3 (bei 340 nm)

Hieraus ergibt sich für eine Messung bei 340 nm:

$$c_{\text{Ethanol}} [\text{g/L}] = 0,190 \times \Delta E$$

**Alkohol in Volumenprozent:**

$$\text{Vol.-%} = c_{\text{Ethanol}} [\text{g/L}] / 7,8924 \text{ (bei } 20 \text{ °C)}$$

**Hinweise**

- Aufgrund der hohen Empfindlichkeit, unbedingt in ethanolfreier Umgebung oder mit luftdicht verschlossenen Küvetten arbeiten.
- Das Probenvolumen sollte mindestens 100 µL betragen.
- Präzision ist stark von der Pipettiertechnik abhängig.

**Leistungsdaten**

**Spezifität**

A-DH 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. Wird der empfohlene Messbereich von 30 bis 300 mg/L überschritten, die Proben mit dest. Wasser auf eine Konzentration innerhalb des Messbereichs verdünnen. Verdünnungsfaktor bei der Berechnung berücksichtigen.

**Sensitivität**

Die untere Nachweisgrenze (LoD) und die Quantifizierungsgrenze (LoQ) wurden nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung für ein Probenvolumen von v = 100 µL ermittelt. Hieraus ergibt sich ein LoD von 1,9 mg/L und ein LoQ von 3,3 mg/L.

**Automatisierung & Validierungsberichte**

Applikationsempfehlungen für Auto-Analysegeräte und Kundenvalidierungsberichte sind auf Anfrage erhältlich.

**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.