

Enzymatische UV-Bestimmung von D-Milchsäure 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 zur quantitativen Bestimmung von D-Milchsäure mit D-Lactat-Dehydrogenase (D-LDH).

Zur Bestimmung der Summe von D- und L-Milchsäure eignet sich der Test Enzytec™ Liquid D-/L-Lactic acid E8240. Sollte lediglich die Konzentration von L-Milchsäure benötigt werden, verwenden Sie Enzytec™ Liquid L-Lactic acid E8260 oder ziehen Sie die ermittelte D-Milchsäure-Konzentration vom Ergebnis des Tests E8240 ab.

## Testprinzip

D-Milchsäure wird in Gegenwart des Enzyms D-LDH zu Pyruvat umgesetzt:



Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) wird dabei zu NADH reduziert. Die verbrauchte Menge an NAD ist der umgesetzten Menge an D-Milchsäure äquivalent und wird bei 340 nm vermessen.

## Reagenzien

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig.

- Reagenz 1: 2 x 50 mL (Puffer, D-LDH)
- Reagenz 2: 2 x 12,5 mL (Puffer, NAD)

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

- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen in den Messbereich im Test einsetzen.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Feste Proben zerkleinern und homogenisieren, geeignete Probemenge einwiegen und mit Wasser extrahieren.
- Proteinhaltige Proben mit Carrez-Reagenzien klären.
- Stark fetthaltige Proben mit heißem Wasser extrahieren, dann zur Fettabcheidung abkühlen lassen (Eis oder Kühlschrank). Fettschicht entfernen und wässrige Lösung filtrieren.
- Detaillierter Probenaufarbeitungsleitfaden auf Anfrage erhältlich.

## Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm  
Temperatur: 37 °C oder 20 - 25 °C  
Messung: gegen Luft oder Wasser  
Proben: 20 - 500 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	-
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, das Ende der Reaktion abwarten (ca. 10 min bei 37°C oder 15 min bei 20 - 25 °C inkubieren) und Extinktion E <sub>2</sub> messen.		

Der Reagenzleerwert muss bei jedem Lauf einmalig mitbestimmt und von jedem Probenergebnis abgezogen werden.

## Berechnung der Ergebnisse

### Berechnung bei Probelösungen:

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

df: dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)

RLW: Reagenzleerwert

$$df = \frac{(\text{Probevolumen} + R1)}{(\text{Testvolumen})} = 0,808$$

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

V:	Testvolumen [mL]	= 2,600
MG:	Molekulargewicht [g/mol]	= 90,08
d:	Schichtdicke [cm]	= 1,00
v:	Probevolumen [mL]	= 0,100
ε:	Extinktionskoeffizient NADH [l/mmol x cm]	= 6,3 (bei 340 nm)

Hieraus ergibt sich für eine Messung bei 340 nm:

$$c_{\text{D-Milchsäure}} [\text{g/L}] = 0,3718 \times \Delta E$$

### Berechnung bei Feststoffen:

$$\text{Gehalt}_{\text{D-Milchsäure}} [\text{g}/100 \text{ g}] = \frac{c_{\text{D-Milchsäure}} [\text{g/L}]}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} [\text{g/L}]} \times 100$$

## Leistungsdaten

### Spezifität

Der Test ist spezifisch für D-Milchsäure und zeigt keine Nebenaktivitäten oder Interferenzen mit anderen relevanten organischen Säuren bis 20 g/L. Sulfid und Ascorbinsäure zeigten bei oder unter einer Konzentration von 0,02 g/L keine Interferenzen.

### Linearität & Messbereich

Linearität ist bis 700 mg/L D-Milchsäure gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 20 und 500 mg/L liegt. Wird dieser Bereich überschritten, sollten die Proben mit dest. Wasser auf eine Konzentration innerhalb des Messbereichs 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 in gepufferter wässriger Lösung für ein Probevolumen von v = 100 µL ermittelt. Hieraus ergibt sich ein LoD von 5 mg/L und ein LoQ von 20 mg/L.

Für ein maximales Probevolumen von v = 1000 µL und einem Testvolumen von V = 3,5 mL wurden theoretische LoD- und LoQ-Werte mittels Berechnung nach Lambert-Beer ermittelt. Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt ΔE = 0,005. Daraus ergibt sich ein LoD von 0,21 mg/L. Auf Basis von ΔE = 0,010 wurde ein LoQ von 0,43 mg/L errechnet.

### Automatisierung

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.