

**D-MILCHSÄURE  
(LIQUID READY<sup>TM</sup>)  
PRODUKTANWEISUNGEN**

**SKU: 700007709  
K-DATELQ**

08/25

(50 manuelle Assays pro Kit) oder  
(500 Auto-Analysiergeräte-Assays pro Kit)

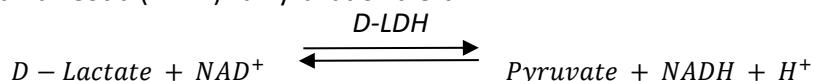
**Megazyme<sup>®</sup>**  
by **NEOGEN<sup>®</sup>**

## EINFÜHRUNG:

D-Milchsäure ist in vielen Lebensmitteln und Getränken enthalten. D-Milchsäure wird auf natürliche Weise von Milchsäurebakterien produziert und kommt in fermentierten Milchprodukten wie Joghurt und Käse sowie in eingelegtem Gemüse, gepökeltem Fleisch und Fisch vor. Die Qualität von Milch, Fleisch und Fruchtsäften kann durch Messung des D-Milchsäuregehalts bestimmt werden. In der Weinindustrie kann die Produktion von D-Milchsäure auf eine Verderbnis des Weins durch Milchsäurebakterien hinweisen.

## GRUNDSATZ:

Die Quantifizierung von D-Milchsäure erfordert zwei Reaktionen. In der ersten Reaktion, die durch D-Lactatdehydrogenase (D-LDH) katalysiert wird, wird D-Milchsäure (D-Lactat) in Gegenwart von Nicotinamidadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) zu Pyruvat oxidiert.



Da das Gleichgewicht der Reaktion eindeutig zugunsten von D-Milchsäure und  $\text{NAD}^+$  liegt, ist eine weitere Reaktion erforderlich, um das Pyruvatprodukt „einzufangen“. Es wird chemisch katalysiert. Die Menge an NADH, die bei der oben genannten gekoppelten Reaktion gebildet wird, ist stöchiometrisch zur Menge an D-Milchsäure. Das NADH wird durch den Anstieg der Extinktion bei 340 nm gemessen.

## SPEZIFITÄT, EMPFINDLICHKEIT UND LINEARITÄT:

- Der Assay ist spezifisch für D-Milchsäure.
- Die Nachweisgrenze (LOD) liegt bei 0,004 g/l, die Bestimmungsgrenze (LOQ) bei 0,011 g/l (bei einem Probenvolumen von 0,1 ml).
- Der empfohlene Messbereich liegt zwischen 0,02 und 0,5 g/l (unter Verwendung eines Probenvolumens von 0,1 ml). Dies entspricht 2–50 µg an D-Milchsäure pro Test.

## INTERFERENZ:

D-Fructose stört bei Konzentrationen über 50 g/l. Ascorbinsäure stört bei Konzentrationen über 1 g/l und Sulfite bei Konzentrationen über 0,1 g/l. Es wird empfohlen, Proben mit angegebenen Gehalten dieser Störstoffe vor der Untersuchung zu verdünnen.

## SICHERHEIT:

Die allgemeinen Sicherheitsmaßnahmen, die für alle chemischen Substanzen gelten, sollten beachtet werden. Nach Gebrauch können die Reagenzien gemäß den örtlichen Vorschriften und Richtlinien mit dem üblichen Laborabfall entsorgt werden.

**HINWEIS:** Weitere Informationen über die Leistung dieses Produkts sind im zugehörigen Validierungsbericht zu finden, der auf der Megazyme-Website verfügbar ist. Weitere Informationen zur sicheren Verwendung und Handhabung dieses Produkts finden Sie im zugehörigen Sicherheitsdatenblatt, das auf der Megazyme-Website verfügbar ist.

## **KIT-INHALT:**

Die Kits sind sowohl für den manuellen als auch für den automatisierten Einsatz konzipiert. Die Reagenzien sind ausreichend für die Durchführung von 50 Assays im manuellen Format oder 500 Assays im automatisierten Format mit einem Analysegerät. Der Kit enthält:

<b>Reagenz 1 (2 x 50 ml):</b>	Puffer, D-LDH Enthält Natriumazid (0,05 % w/v) als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig. <b>Bei 4 °C lagern. Verfallsdatum siehe individuelle Etiketten.</b>
<b>Reagenz 2 (2 x 12,5 ml):</b>	NAD <sup>+</sup> Gebrauchsfertig. <b>Bei 4 °C lagern. Verfallsdatum siehe individuelle Etiketten.</b>
<b>Standard (5 ml):</b>	Milchsäure-Standard (0,5 g/l). Enthält Natriumazid (0,05 % w/v) als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig. <b>Bei 4 °C lagern. Verfallsdatum siehe individuelle Etiketten.</b>

**HINWEIS:** Die D-Milchsäure-Standardlösung wird nur dann getestet, wenn Zweifel an der Genauigkeit des verwendeten Spektralphotometers bestehen oder wenn der Verdacht besteht, dass eine Hemmung durch Substanzen in der Probe verursacht wird. Die Konzentration der D-Milchsäure wird direkt anhand des Extinktionskoeffizienten von NADH bestimmt.

## **VORBEREITUNG DER REAGENZLÖSUNGEN:**

Alle Reagenzien sind vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20–25 °C) zu bringen.

## MANUELLES TESTVERFAHREN:

**Wellenlänge:** 340 nm  
**Küvette:** 1 cm Lichtweg (Glas oder Kunststoff)  
**Temperatur:** 20–37 °C  
**Endvolumen:** 2,60 ml  
**Probenlösung:** 0,02 g/l bis 0,5 g/l (d. h. 2 µg – 50 µg D-Milchsäure pro Küvette)  
**AbleSEN GEGEN LUFT** (ohne Küvette im Lichtweg) oder gegen Wasser

In die Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Reagenz 1	2,0 ml	2,0 ml
Probe	-	0,1 ml
Destilliertes Wasser	0,1 ml	-
Mischen*, ~ 3 Minuten bei 20–37 °C inkubieren, dann die Extinktionen ablesen ( $A_1$ ) Reagenz 2 wie unten beschrieben hinzugeben:		
Reagenz 2	0,5 ml	0,5 ml
Mischen*, ~ 10 Minuten bei 20–37 °C inkubieren, dann die Extinktionen ablesen ( $A_2$ ). **		

\* Entweder durch Ansaugen mit der Pipettenspitze, die zur Abgabe der Flüssigkeit verwendet wurde, oder durch leichtes Umdrehen nach dem Verschließen der Küvette mit einem Küvettendeckel oder Parafilm®.

\*\* Eventuell muss überprüft werden, ob die Reaktion abgeschlossen ist, indem die Extinktionen weiterhin in Abständen von 1 Minute gemessen werden. Wenn die Reaktion noch nicht abgeschlossen ist, mit der Messung der Extinktionen fortfahren, bis die gemessenen Werte entweder gleich bleiben oder über 1 Minute hinweg konstant ansteigen. Ist diese „Kriechrate“ bei der Probe größer als beim Leerwert, müssen die Extinktionen (Probe und Leerwert) zurück auf den Zeitpunkt der Zugabe von Reagenz 2 extrapoliert werden.

**HINWEIS:** Der Reagenzleerwert muss für jeden Lauf einmal bestimmt und von jedem Probenergebnis subtrahiert werden.

## BERECHNUNG:

**HINWEIS:** Diese Berechnungen können mit dem Tool *MegaCalc™* vereinfacht werden, das von der Produktseite heruntergeladen werden kann.

### 1. Berechnung des Verdünnungsfaktors (df)

Bestimmen Sie den Verdünnungsfaktor (df) anhand der Komponentenverhältnisse:

$$df = \frac{\text{Probenvolumen [ml]} + R1\text{-Volumen [ml]}}{\text{Gesamtes Reaktionsvolumen [ml]}}$$

Folgendes gilt für das manuelle D-Milchsäure-Testverfahren:

$$df = \frac{0,1 + 2,0}{2,6} = 0,808$$

### 2. Berechnung der Extinktionsdifferenz $\Delta A_{D\text{-Milchsäure}}$

$$\Delta A_{D\text{-Milchsäure}} = (A_2 - df \times A_1)_{\text{Probe}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{Leerwert}}$$

Folgendes gilt für das manuelle D-Milchsäure-Testverfahren:

$$\Delta A_{\text{Milchsäure}} = (A_2 - 0,808 \times A_1)_{\text{sample}} - (A_2 - 0,808 \times A_1)_{\text{Leerwert}}$$

**HINWEIS:** Eine Vergrößerung oder Verkleinerung des Probenvolumens bei unverändertem Reagenzienvolumen erfordert eine Neuberechnung des Verdünnungsfaktors. Wenn die Volumina geändert werden, kann die Leistung beeinträchtigt werden.

### 3. Berechnung des D-Milchsäure-Gehalts

Die Konzentration von D-Milchsäure kann wie folgt berechnet werden:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A_{D\text{-Milchsäure}} \quad [\text{g/l}]$$

wobei:

V = endgültiges Volumen [ml]

MW = Molekulargewicht der D-Milchsäure [g/mol]

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm [ $\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ]

d = Strahlengang [cm]

v = Probenvolumen [ml]

Folgendes gilt für das manuelle D-Milchsäure-Testverfahren:

$$c = \frac{2,6 \times 90,1}{6300 \times 1,0 \times 0,1} \times \Delta A_{D\text{-Milchsäure}} \quad [\text{g/l}]$$

$$= 0,3718 \times \Delta A_{D\text{-Milchsäure}} \quad [\text{g/l}]$$

Wurde die Probe während der Vorbereitung verdünnt, ist das Ergebnis mit dem Proben-Verdünnungsfaktor F zu multiplizieren.

#### 4. Berechnung des D-Milchsäure-Gehalts in festen oder halbfesten Proben:

Bei der Analyse von festen und halbfesten Proben, die für die Probenvorbereitung gewogen werden, wird der Gehalt (g/100 g) aus der gewogenen Menge wie folgt berechnet:

$$\frac{C_{D\text{-Milchsäure}} \text{ [g/l Probenlösung]}}{\text{Gewicht}_{\text{Probe}} \text{ [g/l Probenlösung]}} \times 100 \quad \text{[g/100 g]}$$

## AUTOMATISIERTES TESTVERFAHREN MIT EINEM ANALYSEGERÄT:

Dieser Kit wurde für automatische biochemische Analysegeräte entwickelt und kann an die meisten Geräte angepasst werden. Nachfolgend ist eine Beispielmethode dargestellt (validiert auf dem Awareness ChemWell®-T-Analysegerät).

**HINWEIS:** Für jede Probencharge, die für die Bestimmung von D-Milchsäure verwendet wird, muss gleichzeitig eine Kalibrierungskurve mit derselben Reagenziencharge erstellt werden.

Parameter	Details								
Wellenlänge	340/405 nm (primär/sekundär)								
Temperatur	20–37 °C								
Test	<p>Endpunkttest mit folgender Testfolge:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>– Reagenz 1 hinzugeben <b>[0,2 ml]</b></li><li>– Probe oder Kalibrator hinzugeben <b>[0,01 ml]</b></li><li>– 1–3 Minuten vorinkubieren [20–37 °C]</li><li>– <math>A_1</math> bei 340/405 nm messen</li><li>– Reagenz 2 hinzugeben <b>[0,05 ml]</b></li><li>– 10 Minuten bei [20–37 °C] inkubieren</li><li>– <math>A_2</math> bei 340/405 nm messen</li><li>– <math>A_2 - A_1</math> gegen die Kalibrierkurve berechnen</li></ul>								
Kalibrierung	<p>Mit 2–4 Kalibratoren im Bereich von 0–0,5 g/l kalibrieren. Die Kalibrierkurve ist linear.</p> <p>Ein Beispiel für die Verwendung des mit dem Kit gelieferten Standards zur Erstellung einer Kalibrierungskurve ist unten dargestellt:</p> <table><tbody><tr><td>Kalibrator 1</td><td>0 g/l (destilliertes Wasser verwenden)</td></tr><tr><td>Kalibrator 2</td><td>0,05 g/l (Standard 10-fach verdünnen)</td></tr><tr><td>Kalibrator 3</td><td>0,25 g/l (Standard 2-fach verdünnen)</td></tr><tr><td>Kalibrator 4</td><td>0,5 g/l (Standard unverändert verwenden)</td></tr></tbody></table> <p><i>Alle Verdünnungen mit destilliertem Wasser durchführen.</i></p>	Kalibrator 1	0 g/l (destilliertes Wasser verwenden)	Kalibrator 2	0,05 g/l (Standard 10-fach verdünnen)	Kalibrator 3	0,25 g/l (Standard 2-fach verdünnen)	Kalibrator 4	0,5 g/l (Standard unverändert verwenden)
Kalibrator 1	0 g/l (destilliertes Wasser verwenden)								
Kalibrator 2	0,05 g/l (Standard 10-fach verdünnen)								
Kalibrator 3	0,25 g/l (Standard 2-fach verdünnen)								
Kalibrator 4	0,5 g/l (Standard unverändert verwenden)								

## PROBENVORBEREITUNG:

### 1. Probenverdünnung

Die in der Probe vorhandene Menge an D-Milchsäure sollte zwischen 0,02 und 0,5 g/l liegen. Ist der Wert von D-Milchsäure zu niedrig (z. B. < 0,1), muss mehr Probe eingewogen oder die Verdünnung verringert werden. Ist der Wert von  $\Delta A_{D\text{-Milchsäure}}$  zu hoch (z. B. > 2,0), muss die Verdünnung mit destilliertem Wasser erhöht werden.

**Tabelle zur Probenverdünnung**

Geschätzte Konzentration von D-Milchsäure (g/l)	Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor (F)
< 0,5	Keine Verdünnung erforderlich	1
0,5 – 5	1 ml Probe + 9 ml Wasser	10
5 - 50	1 ml Probe + 99 ml Wasser	100

### 2. Allgemeiner Leitfaden für die Probenvorbereitung

- Klare, leicht gefärbte und annähernd neutrale, flüssige Proben mit einer Konzentration von bis zu 0,5 g/l D-Milchsäure können direkt für den Test verwendet werden.
- Trübe Proben sollten filtriert oder zentrifugiert werden.
- Saure Proben ( $\text{pH} < 3,0$ ) müssen auf etwa  $\text{pH} 8,0$  neutralisiert werden.
- Kohlendioxidhaltige Proben sollten durch leichtes Schütteln oder Rühren mit einem Glasstab entgast werden.
- Feste Proben sollten homogenisiert, in Wasser extrahiert und gegebenenfalls filtriert oder zentrifugiert werden.
- Stark gefärbte Proben sollten durch Zugabe von 0,2 g Polyvinylpolypyrrrolidon (PVPP) pro 10 ml Probe in einem Röhrchen behandelt werden. Das Röhrchen wird 5 Minuten lang kräftig geschüttelt und dann durch Filterpapier filtriert.
- Proben mit dem Carrez Clarification Kit (700004270) entproteinisieren.
- Fett mit dem Carrez Clarification Kit (700004270, K-CARREZ) entfernen.

### 3. Beispiele für die Probenvorbereitung

- (a) **Bestimmung von D-Milchsäure in Wein.** Zur Klärung durch ein 0,2-Mikron-Spritzenfilter laufen lassen. Alternativ kann eine Aliquote des Essigs 5 Minuten lang bei 15.000 g zentrifugiert werden. *In der Regel ist für Rotwein eine 5-fache Verdünnung in destilliertem Wasser erforderlich, während Weißwein nicht verdünnt werden muss.*
- (b) **Bestimmung von D-Milchsäure in Bier (z. B. Lager).** Karbonisierung durch etwa 60 Sekunden langes Umrühren der Probe mit einem Glasstab entfernen. Durch ein 0,2-Mikron-Spritzenfilter laufen lassen und das klare Filtrat für den Test verwenden. *In der Regel ist keine Verdünnung erforderlich.*

- (c) **Bestimmung von D-Milchsäure in fermentierten Milchprodukten (z. B. Sauerrahm).** 10 g des fermentierten Produkts in einen 50-ml-Messkolben einwiegen, die folgenden Lösungen hinzufügen und nach jeder Zugabe mischen: 5 ml Carrez I-Lösung, 5 ml Carrez II-Lösung und 10 ml NaOH-Lösung (100 mM). Bis zur Marke mit destilliertem Wasser auffüllen, gründlich mischen und mit einem Papierfilter filtrieren. *In der Regel ist keine weitere Verdünnung erforderlich.*
- (d) **Bestimmung von D-Milchsäure in Fleischprodukten (z. B. Salami).** Feste Proben in einem Mixer homogenisieren und 5 g des repräsentativen Materials genau in eine 100-mL Flasche (z. B. Duran®-Flasche einwiegen). 20 ml 1 M Perchlorsäure hinzugeben und mit einem Spatel 5 Minuten lang mischen, oder bis die Probe gleichmäßig dispergiert ist. 40 ml destilliertes Wasser hinzufügen und weitere 10 Minuten mit einem Rührstab rühren. Den pH-Wert mit 8 M Kaliumhydroxid auf 7,0 einstellen, die Suspension quantitativ in einen Messkolben überführen und mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen. Auf Eis oder im Kühlschrank 20 Minuten lang lagern, damit das Kaliumperchlorat ausfällt und das Fett abgetrennt werden kann. Filtrieren, die ersten 3 bis 5 ml entsorgen und das klare Filtrat für das Assay verwenden. *In der Regel ist keine weitere Verdünnung erforderlich.*
- (e) **Bestimmung von D-Milchsäure in Sauerkrautsaft.** Zur Klärung durch ein 0,2-Mikron-Spritzenfilter laufen lassen. Alternativ kann eine Aliquote des Safts 5 Minuten lang bei 15.000 g zentrifugiert werden. *In der Regel ist eine 20-fache Verdünnung in destilliertem Wasser erforderlich (Sensitive Range).*

**WICHTIGER HINWEIS:** Die oben genannten Beispiele sind lediglich Vorschläge für die Probenvorbereitung. Wenden Sie sich mit evtl. Fragen zu diesen oder anderen Matrices bitte an Ihren örtlichen Vertriebsmitarbeiter.

## SERVICES UND TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG

Bitte wenden Sie sich an Ihren örtlichen Vertriebsmitarbeiter, wenn Sie Unterstützung benötigen, insbesondere im Zusammenhang mit:

- Fehlerbehebung
- Datenanalyse
- Zusätzliche Matrixtests
- Anwendungsunterstützung bezüglich automatisierter Analysegeräte

Unterstützende Dokumente sind auf der Produktseite zu finden:

- Kurzreferenz-Leitfaden
- MegaCalc™
- Sicherheitsdatenblätter (SDS)
- Analysezertifikate (COA)
- Validierungsbericht



---

Kontaktieren Sie uns für weitere Informationen: [neogen.com/contact](http://neogen.com/contact)

---

#### **Ohne Gewähr**

Die in diesem Assay-Protokoll enthaltenen Informationen sind nach unserem besten Wissen und Gewissen wahrheitsgetreu und genau. Da sich die Anwendungsbedingungen jedoch unserer Kontrolle entziehen, wird keine Garantie für etwaige Empfehlungen oder Vorschläge oder dafür, dass die Verwendung keinen Patenten schadet, gegeben oder impliziert.

#### **Verantwortung des Benutzers:**

- Es liegt in der Verantwortung des Benutzers, sich mit den Produktanweisungen und -informationen vertraut zu machen. Besuchen Sie unsere Website unter [neogen.com](http://neogen.com) oder wenden Sie sich an Ihren lokalen Neogen®-Vertreter oder autorisierten Händler, um weitere Informationen zu erhalten.
- Bei der Auswahl einer Testmethode ist es wichtig zu berücksichtigen, dass externe Faktoren wie Probenahmemethoden, Testprotokolle, Probenvorbereitung, Handhabung, Labortechnik und die Probe selbst die Ergebnisse beeinflussen können.
- Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, bei der Auswahl einer Prüfmethode oder eines Produkts eine ausreichende Anzahl von Proben mit den geeigneten Matrizen und Herausforderungen zu bewerten, um sich davon zu überzeugen, dass die gewählte Prüfmethode seinen Kriterien entspricht.
- Es liegt auch in der Verantwortung des Benutzers, festzustellen, ob alle Testmethoden und -ergebnisse den Anforderungen seiner Kunden und Lieferanten entsprechen.
- Wie bei jeder Prüfmethode stellen die erzielten Ergebnisse keine Garantie für die Qualität der geprüften Matrizen oder Prozesse dar.

#### **Bedingungen:**

Die vollständigen Geschäftsbedingungen von Neogen sind [online](#) verfügbar.