

**ETHANOL
(LIQUID READY™)
PRODUKTANWEISUNGEN**

**SKU: 700007710
K-ETOHLQ**

08/25

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

Megazyme®
by **NEOGEN®**

EINFÜHRUNG:

Ethanol kommt in der Natur überall vor. Deine quantitative Bestimmung ist daher nicht nur für die Herstellung von Wein, Bier und Spirituosen wichtig, sondern auch für alkoholarme und alkoholfreie Getränke, Fruchtsäfte und eine Reihe anderer Lebensmittel, darunter Schokolade, Süßigkeiten, Marmelade, Honig, Essig und Milchprodukte.

GRUNDSATZ:

Alkoholdehydrogenase (AIDH) katalysiert die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd in Verbindung mit der Reduktion von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+).



Die Menge an NADH+, die im obigen Reaktionsweg gebildet wird, ist stöchiometrisch mit der Menge an Ethanol. Das NADH wird durch die Erhöhung der Extinktion bei 340 nm gemessen.

SPEZIFITÄT, EMPFINDLICHKEIT UND LINEARITÄT:

- Der Assay ist spezifisch für Ethanol.
- Die Nachweisgrenze (LOD) liegt bei 0,002 g/l, die Bestimmungsgrenze (LOQ) bei 0,005 g/l (bei einem Probenvolumen von 0,1 ml).
- Der empfohlene Messbereich liegt zwischen 0,01 und 0,3 g/l (unter Verwendung eines Probenvolumens von 0,1 ml). Dies entspricht 1 bis 30 µg Ethanol pro Test.

INTERFERENZ:

Es wurden keine interferierenden Verbindungen identifiziert.

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:

Reagenz 1 (2 x 50 ml):	Puffer Enthält Natriumazid (0,02 % w/v) als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig. Bei 4 °C lagern. Verfallsdatum siehe individuelles Etikett.
Reagenz 2 (2 x 12,5 ml):	NAD ⁺ , AIDH Enthält Natriumazid (0,02 % w/v) als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig. Bei 4 °C lagern. Verfallsdatum siehe individuelles Etikett.
Standard (5 ml):	Ethanol-Standard (0,3 g/l). Enthält Natriumazid (0,02 % w/v) als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig. Bei 4 °C lagern. Verfallsdatum siehe individuelles Etikett.

HINWEIS: Die Ethanol-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 von Ethanol 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: 0,01 g/l bis 0,3 g/l (d. h. 1 µg – 30 µg Ethanol 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*, ~ 7 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 Minuten 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 Ethanol-Testverfahren:

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

2. Berechnung der Extinktionsdifferenz $\Delta A_{\text{Ethanol}}$

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

Folgendes gilt für das manuelle Ethanol-Testverfahren:

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

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 Ethanolgehalts in g/l

Die Ethanolkonzentration kann wie folgt berechnet werden:

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

wobei:

V = endgültiges Volumen [ml]

MW = Molekulargewicht des Ethanol [g/mol]

ϵ = 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 Ethanol-Testverfahren:

$$c = \frac{2,6 \times 46,07}{6300 \times 1,0 \times 0,1} \times \Delta A_{\text{Ethanol}} \quad [\text{g/l}]$$

$$= 0,1901 \times \Delta A_{\text{Ethanol}} \quad [\text{g/l}]$$

4. Berechnung des Ethanolgehalts in % (v/v):

Zur Berechnung des Alkoholgehalts in Volumenprozent (v/v) für Ethanol:

$$c = \frac{2,6 \times 46,07}{6300 \times 1,0 \times 0,1} \times 0,1266 \times \Delta A_{\text{Ethanol}} \quad [\% \text{ v/v}]$$

$$= 0,0241 \times \Delta A_{\text{Ethanol}} \quad [\% \text{ v/v}]$$

wobei:

0,1266 = Faktor zur Umrechnung von g/l in % (v/v), wobei die Dichte von reinem Ethanol mit 0,79 g/ml angenommen wird.

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

5. Berechnung des Ethanolgehalts 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:

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

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 Ethanol verwendet wird, muss gleichzeitig eine Kalibrierungskurve mit derselben Reagenziencharge erstellt werden.

Parameter	Details								
Wellenlänge	340/405 nm (primär/sekundär)								
Temperatur	20–37 °C								
Test	Endpunkttest mit folgender Testfolge: <ul style="list-style-type: none">– Reagenz 1 hinzugeben [0,2 ml]– Probe oder Kalibrator hinzugeben [0,01 ml]– 1–3 Minuten vorinkubieren [20–37 °C]– A₁ bei 340/405 nm messen– Reagenz 2 hinzugeben [0,05 ml]– 7 Minuten bei [20–37 °C] inkubieren– A₂ bei 340/405 nm messen– A₂ – A₁ gegen die Kalibrierkurve berechnen								
Kalibrierung	Mit 2–4 Kalibratoren im Bereich von 0–0,3 g/l kalibrieren. Die Kalibrierkurve ist linear. Ein Beispiel für die Verwendung des mit dem Kit gelieferten Standards zur Erstellung einer Kalibrierungskurve ist unten dargestellt: <table><tbody><tr><td>Kalibrator 1</td><td>0 g/l (destilliertes Wasser verwenden)</td></tr><tr><td>Kalibrator 2</td><td>0,03 g/l (Standard 10-fach verdünnen)</td></tr><tr><td>Kalibrator 3</td><td>0,15 g/l (Standard 2-fach verdünnen)</td></tr><tr><td>Kalibrator 4</td><td>0,3 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	0,03 g/l (Standard 10-fach verdünnen)	Kalibrator 3	0,15 g/l (Standard 2-fach verdünnen)	Kalibrator 4	0,3 g/l (Standard unverändert verwenden)
Kalibrator 1	0 g/l (destilliertes Wasser verwenden)								
Kalibrator 2	0,03 g/l (Standard 10-fach verdünnen)								
Kalibrator 3	0,15 g/l (Standard 2-fach verdünnen)								
Kalibrator 4	0,3 g/l (Standard unverändert verwenden)								

PROBENVORBEREITUNG:

1. Probenverdünnung

Die in der Probe vorhandene Menge an Ethanol sollte zwischen 0,01 und 0,3 g/l liegen. Ist der Wert von $\Delta A_{\text{Ethanol}}$ zu niedrig (z. B. < 0,1), muss mehr Probe eingewogen oder die Verdünnung verringert werden. Ist der Wert von $\Delta A_{\text{Ethanol}}$ zu hoch (z. B. > 2,0), muss die Verdünnung mit destilliertem Wasser erhöht werden.

Tabelle zur Probenverdünnung

Geschätzte Konzentration von Ethanol (g/l)	Verdünnung mit Wasser	Proben-Verdünnungsfaktor (F)
< 0,3	Keine Verdünnung erforderlich	1
0,3 – 3	1 ml Probe + 9 ml Wasser	10
3 - 30	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 0,3 g/l können direkt für den Test verwendet werden.
- Trübe Proben sollten filtriert oder zentrifugiert werden.
- Saure Proben ($\text{pH} < 3,0$) müssen auf etwa 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 Ethanol 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 1000-fache Verdünnung in destilliertem Wasser erforderlich, während Weißwein nicht verdünnt werden muss.*

(b) Bestimmung von Ethanol in „alkoholfreien“ Bieren: Durch Rühren einer Probe in einem Becherglas und Erhöhung des pH-Werts auf etwa pH 9 mit 2 M Natriumhydroxid wird die Karbonatisierung entfernt. Durch ein 0,2-Mikron-Spritzenfilter laufen lassen und das klare Filtrat für den Test verwenden. *In der Regel ist eine 20-fache Verdünnung erforderlich.*

- (c) **Bestimmung von Ethanol in „alkoholfreien“ Spirituosen (z. B. alkoholfreiem Gin):** Die Ethanolkonzentration von alkoholfreien Spirituosen kann in der Regel ohne Probenvorbereitung bestimmt werden (mit Ausnahme der Verdünnung gemäß der Verdünnungstabelle). *In der Regel ist eine 10-fache Verdünnung mit destilliertem Wasser erforderlich*
- (d) **Bestimmung von Ethanol in rohem, nicht pasteurisiertem Kombucha.** Durch Rühren einer Probe in einem Becherglas und Erhöhung des pH-Werts auf etwa pH 9 mit 2 M Natriumhydroxid wird die Karbonatisierung entfernt. Durch ein 0,2-Mikron-Spritzenfilter laufen lassen und das klare Filtrat für den Test verwenden. *In der Regel ist eine 10-fache Verdünnung erforderlich.*
- (e) **Bestimmung von Ethanol in Fruchtsaft (z. B. Tomatensaft):** Zur Klärung durch ein 0,2-Mikron-Spritzenfilter laufen lassen. Alternativ kann eine Aliquote des Weins 5 Minuten lang bei 15.000 g zentrifugiert werden. *In der Regel ist eine zweifache Verdünnung erforderlich.*

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

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 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.