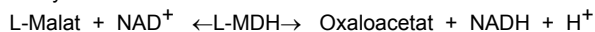
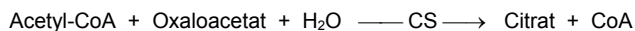
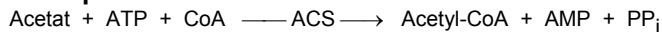


UV-Methode für ca. 32 Ansätze

Nur für den Laborgebrauch
Lagern bei +2 bis +8°C

Die Methode ist enthalten im deutschen und niederländischen Lebensmittelrecht. Empfohlen z.B. von IFU, AIJN, MEBAK. Standardisiert vom DIN, EN.

Prinzip



Ref.: Beutler, H.-O. (1964) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 639-645, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Berach/Florida, Basel

Durchführung der Bestimmung

- Wellenlänge: 340 nm (NADH)
ε = 6,3 l x mmol⁻¹ x cm⁻¹
- Schichtdicke: 1,00 cm (Glas oder Plastikkuvette)
- Temperatur: +20 bis +25°C
- Testvolumen: 3,230 ml
- Messung: gegen Luft oder Wasser
- Probelösung: 0,3 bis 30 µg Essigsäure in 0,100 bis 2,000 ml Probelösung

Reagenzien

- # 1: Ca. 32 ml Triethanolamin-Puffer, pH ca. 8,4; ca. 134 mg L-Äpfelsäure; ca. 67 mg Magnesiumsulfat-hexa-hydrat (Stabilität, siehe Packungsetikett). *Die Lösung ist gebrauchsfertig.*
- # 2: Lyophilisat mit ca. 175 mg ATP, ca.18 mg CoA und ca. 86 mg NAD. (Stabilität, s. Packungsetikett). *Inhalt der Flasche # 2 mit 7 ml bidest. Wasser lösen.* Die Lösung ist 1 Monat bei +2 bis +8 °C, bzw. 2 Monate bei -15 bis -25 °C stabil.
- # 3: Ca. 0,4 ml Suspension L-Malat-Dehydrogenase / Citrat-Synthase (L-MDH / CS) (ca. 1100 U / 270 U) in Ammoniumsulfat (Stabilität siehe Packungsetikett). *Die Suspension ist gebrauchsfertig.* Flasche vorsichtig schwenken bevor die Suspension pipettiert wird.
- # 4: Ca. 0,7 ml Suspension mit ca. 16 U von Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) in Ammoniumsulfat (Stabilität s. Packungsetikett). *Die Suspension ist gebrauchsfertig.* Flasche vorsichtig schwenken bevor die Suspension pipettiert wird.

Zusätzlich wird benötigt (nicht im Kit enthalten):

Standard-Lösung Essigsäure, 0,15 g/l zur Testkontrolle.

Die Reagenzien zur Bestimmung von Essigsäure sind nicht gefährlich. Die allgemeinen Regeln beim Arbeiten in chemischen Laboratorien sollten jedoch eingehalten werden. Nach Gebrauch können die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgt werden. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

Bestimmungsansatz

In Küvetten pipettieren:	Leerwert	Standard ¹	Probe ²	Ansatz Duplikat Probe ³	Ansatz mit internem Standard ⁴	Ansatz für Spuren-Analytik ⁵
Tea-Puffer # 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
ATP, CoA, NAD-Lösung # 2	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml
Probelösung⁶ (z. B. 0,015 bis 0,15 g Essigsäure/l)	-	-	0,100 ml	0,200 ml	0,100 ml	2,000 ml
Standardlösung ⁶ (z. B. 0,15 g Essigsäure / l)	-	0,100 ml	-	-	0,100 ml	-
Bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	1,800 ml	1,800 ml	-
Mischen⁷, Extinktionen (E₀) messen. Zugeben:						
L-MDH/CS-Suspension # 3	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml
Mischen⁷, nach ca. 3 min Extinktionen (E₁) messen. Zugeben:						
ACS-Lösung # 4	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Mischen⁷, nach ca. 10 to 15 min Extinktionen (E₂) messen. Extinktionsmessungen nach weiteren 2 min wiederholen⁸.						

Hinweise:

- 1 Das Mitführen eines "Standards" dient ausschließlich zur Erkennung von Unregelmäßigkeiten in der Analyse. Die Messung des Standards wird nicht benötigt zur Berechnung von Ergebnissen.
- 2 Dieser Ansatz zusammen mit dem Leerwert ist eine "Einzelbestimmung".
- 3 Im Fall einer "Doppelbestimmung" werden 2 Ansätze mit verschiedenen Probevolumina ausgeführt. Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein. Ergebnisse mit den entsprechenden Probevolumina v berechnen.
- 4 Wiederfindung = [(ΔE_{Probe+Standard} - ΔE_{Probe}) / ΔE_{Standard}] x 100 [%]
- 5 In der Spurenanalytik wird empfohlen, das Probevolumen bis zu 2,000 ml (0,00015 bis 0,015 g Essigsäure / l) zu erhöhen.
- 6 Vor der Dosierung Enzympipetten, bzw. Spitzen der Kolbenhubpipetten mit Probe- bzw. Standardlösung mehrfach vorspülen.
- 7 z. B. mit einem Plastikspatel, oder durch Umschwenken nach Verschließen der Küvette mit Parafilm® (American Can Co., Greenwich Ct., USA).
- 8 Die Reaktion ist beendet, wenn die gemessene Extinktion (Probe gegen Leerwert) konstant ist. Ist dies nicht der Fall, die Ansätze, die die Probelösung enthalten, weiter in Abständen von 2 min messen, bis die Extinktionszunahme konstant ist. Extinktionen auf die Zeit der Zugabe von ACS (Lösung # 4) extrapolieren.



Berechnung

Bestimmen Sie die Extinktionsdifferenzen ($E_1 - E_0$) und ($E_2 - E_0$) für Leerwert und Probe. Die Berechnung von ΔE unterscheidet sich von den Berechnungen in anderen enzymatischen Tests, denn mit dem Gleichgewicht der vorhergehenden Indikator-Reaktion gibt es keine lineare (direkte) Proportionalität zwischen der gemessenen Extinktionsdifferenz und der Essigsäure-Konzentration. Die folgende Formel, die im Allgemeinen für vorhergehenden Indikator Reaktionen verwendet werden sollte, wird benötigt:

$$\Delta E_{\text{Essigsäure}} = \left[(E_2 - E_0)_{\text{Probe}} - \frac{(E_1 - E_0)_{\text{Probe}}^2}{(E_2 - E_0)_{\text{Probe}}} \right] - \left[(E_2 - E_0)_{\text{Blank}} - \frac{(E_1 - E_0)_{\text{Blank}}^2}{(E_2 - E_0)_{\text{Blank}}} \right]$$

Um gesicherte, reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten sollte die Extinktionsdifferenz ΔE zwischen 0,100 und 1,000 betragen.

Die Konzentration wird im allgemeinen mit dem Lambert-Beer Gesetz kalkuliert:

$$c = (V \times MG \times \Delta E) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \text{ [g Essigsäure/l Probelösung]}$$

$$c = (3,230 \times 60,05 \times \Delta E) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,3079 \times \Delta E \text{ [g Essigsäure/l]}}$$

Wurde bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen, muss das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert werden.

Bei der Analyse von Proben, die für die Analyse eingewogen werden, wird das Ergebnis auf die Einwaage bezogen:

$$\text{Gehalt}_{\text{Essigsäure}} = \frac{C_{\text{Essigsäure}} \text{ [g/l Probelösung]}}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ [in g/l Probelösung]}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$

Vorbereitung der Proben

1. *Klare, farblose, annähernd neutrale flüssige* Proben ggf. verdünnen, um eine Probelösung mit 0,015 bis 0,15 g Essigsäure/l zu erhalten.
2. *Trübe Lösungen* filtrieren oder zentrifugieren, ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
3. *Kohlensäurehaltige Proben*, z. B. durch Filtration entgasen, oder NaHCO_3 zugeben, bis die Lösung schwach alkalisch ist. Ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
4. *Saure (insbesondere leicht gefärbte)* Lösungen mit KOH oder NaOH auf pH 8 bis 9 einstellen, einige Minuten inkubieren, oder im Fall von farblosen Proben ohne pH-Einstellung verdünnen (s. Pkt. 1).
5. *„Stark gefärbte Lösungen“*, die unverdünnt gemessen werden, mit Aktivkohle, PVPP oder Polyamid, z. B. 1 g/100 ml, behandeln, mischen, einige Minuten inkubieren, filtrieren.
6. *Feste Proben* zerkleinern (Korngröße < 0.3 mm), bzw. halb feste (pastöse) Proben homogenisieren, mit Wasser extrahieren, oder in Wasser lösen, filtrieren und ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
7. *Fetthaltige Proben* mit heißem Wasser (Temperatur über dem Schmelzpunkt des Fettes), z. B. in einem 100 ml-Messkolben extrahieren. Auf +20°C bringen, Messkolben bis zur Marke füllen. 15 min in Eis, bzw. 30 min in Kühlschrank stellen, filtrieren. Alternativ mit Carrez Reagenzien klären (wird empfohlen).
8. *Proteinhaltige Proben* mit Carrez-Reagenzien klären:
Ausreichende Menge der festen oder pastösen Probe in einen 100 ml-Messkolben einwiegen, ca. 60 ml Wasser zugeben. Oder flüssige Probe in einen 100 ml-Messkolben, der ca. 60 ml Wasser enthält, pipettieren. Nacheinander zugeben und nach jeder Zugabe mischen: 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3\text{H}_2\text{O}$ = Kalium-hexa-cyanoferrat(II)/100 ml), 5 ml Carrez-II-Lösung (7,20 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ = Zink-sulfat-hepta-hydrat/100 ml). Durch Zugabe von z. B. 10 ml NaOH (0,1 M) pH auf 7,5 bis 8,5 einstellen. Messkolben bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren.
9. *Proteinhaltige Proben* mit Perchlorsäure deproteinieren.

Eigenschaften des Tests

1. *Spezifität* Spezifisch für Essigsäure. Bei der Analyse von handelsüblichem Eisessig werden Ergebnisse von 100 % erwartet, bei der Analyse von wasserfreiem Natrium-acetat Ergebnisse von < 100 %, da die Substanz feuchtigkeitsempfindlich ist.
2. *Empfindlichkeit:* 0,1 mg Essigsäure/l ($\Delta E = 0,005$; $v = 2,000 \text{ ml}$; $V = 3,230 \text{ ml}$)
3. *Nachweisgrenze:* 0,15 mg Essigsäure/l ($\Delta E = 0,010$; $v = 2,000 \text{ ml}$; $V = 3,230 \text{ ml}$)
4. *Linearität:* 0,3 µg Essigsäure ($v = 2,000 \text{ ml}$; $V = 3,230 \text{ ml}$)
bis 30 µg Essigsäure/Ansatz ($v = 0,100 \text{ ml}$; $V = 3,230 \text{ ml}$)
5. *Präzision:* $\Delta E = +/- 0,005$ bis $0,010$ Extinktionseinheiten
VK = ca. 1 bis 3 %
Fleischwurst: $x = 0,3 \text{ g/100 g}$ $r = 0,017 \text{ g/100 g}$ $s(r) = +/- 0,006 \text{ g/100 g}$
Tomatenketchup: $R = 0,023 \text{ g/100 g}$ $s(R) = +/- 0,008 \text{ g/100 g}$
 $r = 0,05 \text{ g/100 g}$ $s(r) = +/- 0,02 \text{ g/100 g}$
 $R = 0,07 \text{ g/100 g}$ $s(R) = +/- 0,02 \text{ g/100 g}$
Brot: $x = 131,89 \text{ mg/100 g}$ $r = 7,53 \text{ mg/100 g}$ $s(r) = +/- 2,66 \text{ mg/100 g}$
 $R = 21,12 \text{ mg/100 g}$ $s(R) = +/- 7,46 \text{ mg/100 g}$
Brot: $x = 204,55 \text{ mg/100 g}$ $r = 7,41 \text{ mg/100 g}$ $s(r) = +/- 2,62 \text{ mg/100 g}$
 $R = 19,35 \text{ mg/100 g}$ $s(R) = +/- 6,84 \text{ mg/100 g}$
6. *Störungen:* Essigsäureester (z. B. in Wein) werden unter Testbedingungen langsam hydrolysiert. Das führt zu einer Schleichreaktion, die bei der Berechnung des Ergebnisses durch Extrapolation der Extinktionswerte auf die Zeit der Zugabe der Probelösung berücksichtigt werden muss.
7. *Technische Information:* Essigsäure ist flüchtig. Das ist z.B. bei der Vorbereitung der Probe zu berücksichtigen.