

Essigsäure (Acetat)

UV-Test

zur Bestimmung von Essigsäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien

Best. Nr. 10 148 261 035

Test-Combination für 3 × 11 Bestimmungen

BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM
Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik

Nur zur Verwendung in der Lebensmittelhygiene.

Lagern bei 2-8°C

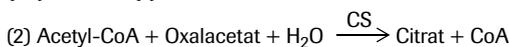
Methoden-Empfehlungen und standardisierte Verfahren s. unter Literatur (2)

Prinzip (Lit. 1)

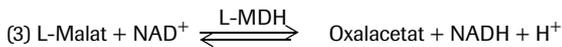
Essigsäure (Acetat) wird in Gegenwart des Enzyms Acetyl-CoA-Synthetase (ACS)¹ durch Adenosin-5'-triphosphat (ATP) und Coenzym A (CoA) zu Acetyl-CoA umgesetzt (1).



Acetyl-CoA reagiert mit Oxalacetat bei Anwesenheit von Citrat-Synthase (CS) zu Citrat (2).



Das für Reaktion (2) benötigte Oxalacetat wird in einer vorgeschalteten Indikatorreaktion aus L-Malat und Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart von L-Malat-Dehydrogenase (L-MDH) gebildet (3). Hierbei wird NAD zu NADH reduziert.



Der Bestimmung liegt eine NADH-Bildung, gemessen an der Extinktionszunahme bei 340, 334 oder 365 nm, zugrunde. Da bei der vorgeschalteten Indikatorreaktion ein Gleichgewicht vorliegt, ist die NADH-Menge der Essigsäure-Konzentration nicht direkt linear proportional (Berechnung s.u.).

Die Test-Combination enthält

- Flasche 1 mit ca. 33 ml Lösung, zusammengesetzt aus: Triethanolamin-Puffer, pH ca. 8,4; L-Äpfelsäure, ca. 134 mg; Magnesiumchlorid x 6 H₂O, ca. 67 mg
- Flasche 2 mit ca. 280 mg Lyophilisat, zusammengesetzt aus: ATP, ca. 175 mg; CoA, ca. 18 mg; NAD, ca. 86 mg
- Flasche 3 mit ca. 0,4 ml Suspension, zusammengesetzt aus: L-Malat-Dehydrogenase, ca. 1100 U; Citrat-Synthase, ca. 270 U
- Drei Flaschen 4 mit Lyophilisat Acetyl-CoA-Synthetase, je ca. 5 U
- Flasche 5 mit Essigsäure-Testkontroll-Lösung zur Testkontrolle (Die Messung der Test-kontroll-Lösung ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen.) Testkontroll-Lösung unverdünnt verwenden. (Verwendbar bis: siehe Packungsetikett).

Herstellung der Lösungen

- Lösung der Flasche 1 unverdünnt verwenden.
- Inhalt der Flasche 2 mit 7 ml bidest. Wasser lösen.
- Suspension der Flasche 3 unverdünnt verwenden.
- Inhalt einer Flasche 4 mit 0,25 ml bidest. Wasser lösen.

Stabilität der Lösungen

Lösung 1 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).
Lösung 1 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.
Der Inhalt der Flasche 2 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).
Lösung 2 ist bei 2-8°C 4 Wochen, bei -15 bis -25°C 2 Monate haltbar.
Der Inhalt der Flasche 3 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).
Der Inhalt der Flaschen 4 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).
Lösung 4 ist bei 2-8°C 5 Tage haltbar.

Bestimmungsansatz

Wellenlänge³: 340 nm, Hg 365 nm oder Hg 334 nm
Glasküvette⁴: 1,00 cm Schichtdicke
Temperatur: 20-25°C
Testvolumen: 3,230 ml
Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette) oder gegen Wasser
Probelösung: 0,3-30 µg Essigsäure/Ansatz⁵ (in 0,100-2,000 ml Probevolumen)

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Lösung 1	1,000 ml	1,000 ml
Lösung 2	0,200 ml	0,200 ml
Probelösung* bidest. Wasser	- 2,000 ml	0,100 ml 1,900 ml
mischen**, Extinktionen der Lösungen messen (E ₀). Zugabe von		
Suspension 3	0,010 ml	0,010 ml
mischen**, nach ca. 3 min Extinktionen der Lösungen messen (E ₁). Reaktion starten durch Zugabe von		
Lösung 4	0,020 ml	0,020 ml
mischen**, Stillstand der Reaktion abwarten (ca. 10-15 min) und Extinktionen der Lösungen messen (E ₂). Falls die Reaktion nach 15 min nicht zum Stillstand gekommen ist, Extinktionen weiter in 2 min-Abständen messen, bis konstante Extinktionszunahme pro 2 min erreicht ist.		

* Vor der Dosierung der Probelösung Enzymtest-Messpipette bzw. Pipettenspitze der Kolbenhubpipette mit der Probelösung vorspülen.

** Z.B. mit Rührspatel oder durch Umschwenken nach Verschließen z.B. mit Parafilm (Warenzeichen der American Can Company, Greenwich, Ct., USA)

Bei konstanter Extinktionszunahme von E₂ wird die Extinktion auf die Zeit der Zugabe von Lösung 4 (ACS) extrapoliert (s. auch Pkt. 7).

Für Leerwert und Probe Extinktionsdifferenzen (E₁-E₀) und (E₂-E₀) berechnen.

Bei der vorgeschalteten Indikatorreaktion (Gleichgewichtsreaktion) besteht keine direkte lineare Proportionalität zwischen der gemessenen Extinktionsdifferenz und der Konzentration der Essigsäure.

Zur Berechnung des ΔE_{Essigsäure} dient folgende allgemein bei vorgeschalteten Indikatorreaktionen anzuwendende Formel (s. hierzu Literaturhinweis 1.2):

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

Die berechnete Extinktionsdifferenz sollte zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Extinktionseinheiten betragen (s. "Hinweise zur Testdurchführung" und "Empfindlichkeit und Nachweisgrenze", Pkt. 4).

Berechnung

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

$$c = \frac{V \times \text{MG}}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E \text{ [g/l]}$$

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient von NADH bei:
340 nm = 6,3 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]
Hg 365 nm = 3,4 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]
Hg 334 nm = 6,18 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]

Hieraus ergibt sich für Essigsäure:

$$c = \frac{3,230 \times 60,05}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E = \frac{1,940}{\varepsilon} \times \Delta E \text{ [g Essigsäure/l Probelösung]}$$

Ist bei der Vorbereitung der Proben eine Verdünnung vorgenommen worden, muss das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert werden.

Bei der Analyse fester und halbfester Proben, die für die Vorbereitung der Proben eingewägt werden, wird das Analysenergebnis auf die Einwaage bezogen:

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

1 ACS auch bekannt als Acetat-Thiokinase

2 AMP = Adenosin-5'-monophosphat

3 Das Absorptionsmaximum von NADH liegt bei 340 nm. Bei Verwendung von Spektralphotometern wird im Absorptionsmaximum, bei Verwendung von Spektral-Linienphotometern mit Hg-Dampflampe bei einer Messstrahlung von 365 nm oder 334 nm gemessen.

4 Anstelle von Glas-Küvetten sind auch handelsübliche Einweg-Küvetten geeignet.

5 S. Hinweise zur Testdurchführung.



1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Essigsäuremenge zwischen 0,6 µg und 30 µg (Messung bei 365 nm) bzw. 0,3 µg und 15 µg (Messung bei 340, 334 nm) betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit zu verdünnen, dass die Essigsäurekonzentration zwischen 0,06 und 0,3 g/l bzw. 0,03 und 0,15 g/l liegt.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge an Essigsäure im Liter		Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor F
Messung bei			
340 oder 334 nm	365 nm		
< 0,15 g	< 0,3 g	-	1
0,15-1,5 g	0,3-3,0 g	1 + 9	10
1,5-15 g	3,0-30 g	1 + 99	100
> 15 g	> 30g	1 + 999	1000

Ist die gemessene Extinktionsdifferenz (ΔE) zu klein (z.B. $< 0,100$), so ist die Probelösung erneut herzustellen (höhere Einwaage oder weniger starke Verdünnung) oder das in die Küvette zu pipettierende Probevolumen (v) ist bis auf 2,000 ml zu erhöhen. In diesem Fall ist das Volumen der hinzuzufügenden Wassermenge entsprechend zu verringern, so dass in den Ansätzen für Probe und Leerwert das gleiche Testvolumen vorliegt. Das geänderte Probevolumen v ist in der Berechnungsformel entsprechend zu berücksichtigen.

2. Technische Hinweise

- Bei der Bestimmung der Essigsäure (saure Proben) ist bei Handhabung der Probe und bei der Vorbereitung der Proben darauf zu achten, dass der Analyt wegen seiner Flüchtigkeit nicht verloren geht. Zur Problemlösung kann die Probe alkalisiert werden: Es entsteht das nicht-flüchtige Acetat.
- Bei der Berechnung ist eindeutig anzugeben, ob die Ergebnisse als Essigsäure (Molmasse 60,05 g/Mol) oder als Acetat (Molmasse 59,04 g/Mol) angegeben werden. (Bei der enzymatischen Bestimmung wird das Acetat-Ion gemessen.)

3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

Die Bestimmung ist spezifisch für Essigsäure.

Bei der Analyse der Reinsubstanz Essigsäure (Eisessig) sind Ergebnisse von ca. 100% zu erwarten (bei der Herstellung der Essigsäurelösung ist auf die Flüchtigkeit der Essigsäure Rücksicht zu nehmen), bei der Analyse der Reinsubstanz Natriumacetat, wasserfrei ist mit Ergebnissen von unter 100% zu rechnen, da die Substanz feuchtigkeitsempfindlich ist.

4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze (Lit. 1.3)

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen $v = 2,000$ ml und Messung bei 340 nm einer Konzentration an Essigsäure von ca. 0,1 mg/l (bei $v = 0,100$ ml entsprechend 1,5 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von 0,15 mg/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,010 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probevolumen $v = 2,000$ ml.

5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von 0,3 µg Essigsäure/ Ansatz (0,15 mg Essigsäure/l Probelösung; Probevolumen $v = 2,000$ ml) bis 30 µg Essigsäure/ Ansatz (0,3 g Essigsäure/l Probelösung; Probevolumen $v = 0,100$ ml).

6. Präzision

Bei einer Doppelbestimmung, ausgehend von einer Probelösung, ist mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,005 bis 0,010 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probevolumen $v = 0,100$ ml und Messung bei 340 nm einer Essigsäure-Konzentration von ca. 1,5-3 mg/l. (Ist bei der Vorbereitung der Proben eine Verdünnung vorgenommen worden, ist mit dem Verdünnungsfaktor F zu multiplizieren. Bei einer Einwaage von 1 g Probe/100 ml = 10 g/l sind die zu erwartenden Unterschiede ca. 0,015-0,03 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten veröffentlicht:

VK = 0,6-1,6 % Essigsäure-Lösungen

VK = 1,5-1,8 % Weisswein

VK = 1,7-2,1 % Rotwein

VK = 2,3-2,8 % Joghurt

(Lit. 1.3)

Fleischwurst:

$x = 0,3$ g/100 g $r = 0,017$ g/100 g $s_{(r)} = \pm 0,006$ g/100 g
 $R = 0,023$ g/100 g $s_{(R)} = \pm 0,008$ g/100 g

Tomatenketchup:

$r = 0,05$ g/100 g $s_{(r)} = \pm 0,02$ g/100 g
 $R = 0,07$ g/100 g $s_{(R)} = \pm 0,02$ g/100 g

Brot:

$x = 131,89$ mg/100 g $r = 7,53$ mg/100 g $s_{(r)} = \pm 2,66$ mg/100 g
 $R = 21,12$ mg/100 g $s_{(R)} = \pm 7,46$ mg/100 g

$x = 204,55$ mg/100 g $r = 7,41$ mg/100 g $s_{(r)} = \pm 2,62$ mg/100 g
 $R = 19,35$ mg/100 g $s_{(R)} = \pm 6,84$ mg/100 g
(Lit. 2.1)

7. Störungen

Essigsäureester können unter den Bedingungen des Testansatzes hydrolysiert werden (Beispiele: Essigsäureethylester in Wein; Acetylsalicylsäure in Pharmaka). Die durch langsame Hydrolyse freigesetzte Essigsäure führt zu Schleichreaktionen, die bei der Berechnung von Ergebnissen berücksichtigt werden müssen (Extrapolation von E_2 auf den Zeitpunkt der Zugabe von Probelösung).

8. Erkennen von Störungen

8.1 Ist die Umsetzung von Essigsäure nach der unter "Bestimmungsansatz" angegebenen Zeit beendet, so kann im allgemeinen auf einen störungsfreien Ablauf geschlossen werden.

8.2 Nach Ablauf der Reaktion kann durch Zugabe von Essigsäure oder Natriumacetat (qualitativ oder quantitativ) die Reaktion wieder gestartet werden: Die erneute Änderung der Extinktion nach Zugabe des Standardmaterials ist ein Beweis für den störungsfreien Ablauf der Bestimmung.

8.3 Grobe Fehler beim Testansatz und Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können auch erkannt werden, wenn aus einer Probelösung eine Doppelbestimmung mit verschiedenen Probevolumina (z.B. 0,100 ml und 0,200 ml) ausgeführt wird: Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein.

Bei der Analytik fester Proben wird die Einwägung verschiedener Mengen (z.B. 1 g und 2 g) in 100 ml-Messkolben empfohlen. Bei gleichen Probevolumina für die Testansätze muss Proportionalität zwischen Extinktionsdifferenz und Einwaage gegeben sein.

8.4 Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können weiterhin durch Mitführen eines internen Standards erkannt werden: Neben Probe-, Leerwert- und Standardansatz wird ein weiterer Ansatz mit Probe- und Testkontroll-Lösung analysiert. Aus den ermittelten Extinktionsdifferenzen wird die Wiederfindung berechnet.

8.5 Verluste während der Vorbereitung der Probe können durch Wiederfindungsversuche erkannt werden: Die Probe wird mit und ohne zugesetztem Standardmaterial vorbereitet und anschließend gemessen. Der Zusatz muss (innerhalb des Analysenfehlers) quantitativ wiedergefunden werden.

9. Gefährlichkeit der Reagenzien

Die Reagenzien zur Bestimmung von Essigsäure (Acetat) enthalten gefährliche Stoffe oder Zubereitungen im Sinne der Gefahrstoffverordnung, des Chemikaliengesetzes oder der EG-Richtlinien 67/548 und 99/45 und deren Änderungs- und Anpassungsrichtlinien. Weitere Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern und auf dem Etikett der betroffenen Flaschen.

10. Allgemeine Hinweise zur Vorbereitung der Proben

Flüssige, klare, farblose und annähernd neutrale Proben direkt, nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle oder mit einem Probenvolumen bis 2,000 ml zum Test einsetzen;

trübe Lösungen filtrieren;

Kohlensäure-haltige Proben (z.B. durch Filtration) entgasen;

saure Proben mit Kalilauge oder Natronlauge auf pH 8-9 einstellen;

saure und schwach gefärbte Proben mit Kalilauge oder Natronlauge auf pH 8-9 einstellen und ca. 15 min stehen lassen;

stark gefärbte Proben, die unverdünnt oder mit einem höheren Probenvolumen zum Test eingesetzt werden, mit Aktivkohle, Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) oder Polyamid (z.B. 1 g/100 ml) behandeln;

feste und halbfeste Proben zerkleinern oder homogenisieren, mit Wasser extrahieren bzw. lösen, wenn nötig filtrieren; ggf. Trübstoffe und Farbstoffe mit Carrez-Reagenzien (s.u.) entfernen;

Protein-haltige Proben mit Perchlorsäure enteiuweissen oder mit Carrez-Reagenzien (s.u.) klären;

Fett-haltige Proben mit heissem Wasser extrahieren (Rückflusskühler; Extraktionstemperatur über dem Schmelzpunkt des jeweiligen Fettes), zur Abscheidung des Fettes abkühlen lassen, Messkolben bis zur Marke auffüllen, 15 min in Eisbad stellen und filtrieren; alternativ nach Extraktion mit heissem Wasser mit Carrez-Reagenzien klären.

Carrez-Klärung:

Geeignete Probemenge in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, ca. 60 ml bidest. Wasser hinzufügen, bzw. flüssige Probe in einem 100 ml-Messkolben, der ca. 60 ml bidest. Wasser enthält, pipettieren. Anschliessend 5 ml Carrez-I-Lösung (Kalium-hexacyanoferrat(II) (Ferrocyanid) 85 mM = 3,60 g $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$ ml) und 5 ml Carrez-II-Lösung (Zinksulfat, 250 mM = 7,20 g $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$ ml) sorgfältig dosieren. Mit Natronlauge (0,1 mM; z.B. 10 ml) pH 7,5-8,5 einstellen. Nach jeder Zugabe mischen, Messkolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren.

11. Anwendungsbeispiele

Bestimmung von Essigsäure in Fruchtsäften

a) Fruchtsäfte mit hohem Essigsäure-Gehalt (z.B. ca. 0,3 g/l): Probe 1+1 mit Wasser verdünnen; 0,100 ml zum Test einsetzen.

b) Fruchtsäfte mit geringem Essigsäure-Gehalt ($\leq 0,02$ g/l):

Gefärbte Säfte entfärben:

Probe mit 1% (w/v) Aktivkohle versetzen, ca. 30s rühren, filtrieren. 0,500 ml zum Test einsetzen (geändertes Probenvolumen v bei der Berechnung berücksichtigen).

Saure Säfte gegebenenfalls (bei Einsatz von hohem Probenvolumen) auf pH 8 einstellen.

Bestimmung von Essigsäure in Wein (Lit. 3.1)

Weisswein unverdünnt mit 0,100 ml (ggf. bis 2,000 ml) zum Test einsetzen.

Rotwein mit etwa 0,2 g Essigsäure/l ohne Entfärben unverdünnt zum Test einsetzen (0,100 ml).

Rotwein mit weniger als 0,1 g Essigsäure/l mit 1% (w/v) Polyamid oder PVPP versetzen, ca. 1 min rühren, filtrieren. Einen aliquoten Teil der weitgehend entfärbten Weinprobe mit Natronlauge (0,1 M) auf pH 8 einstellen (Indikatorpapier), mit bidest. Wasser auf das doppelte Volumen verdünnen; zum Test ggf. bis zu 2,000 ml einsetzen (Verdünnung und geändertes Probenvolumen v bei der Berechnung berücksichtigen).

Hohe Alkohol-Konzentrationen in der Probe können die Acetat-Reaktion verzögern. Daher Extinktionen E_2 erst nach 20 min messen.

Bestimmung von Essigsäure in Weinessig

Die Probe gemäss der vorstehenden Verdünnungstabelle verdünnen und zum Test einsetzen (0,100 ml).

Bestimmung von Essigsäure in Sauertunken und Sossen

Die Probe von Feststoffen trennen, ggf. zur Fettabcheidung ca. 20 min in den Kühlschrank stellen. Filtrieren, auf 20-25°C gebrachtes Filtrat, ggf. nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle, zum Test einsetzen.

Bestimmung von Essigsäure in Bier (Lit. 3.4, 3.5)

Etwa 5-10 ml Bier filtrieren oder im Becherglas 30 s lang mit einem Glasstab zur Entfernung der Kohlensäure rühren. Die weitgehend CO_2 -freie Probe unverdünnt zum Test einsetzen.

Bestimmung von Essigsäure in Hartkäse

Etwa 2 g geriebenen Käse in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, etwa 70 ml Wasser hinzufügen und 20 min bei ca. 60°C halten. Kolben gelegentlich umschwenken. Nach Abkühlen auf 20-25°C mit Wasser auf 100 ml auffüllen. Zur Fettabcheidung 20 min in den Kühlschrank stellen, filtrieren, die ersten ml verwerfen. Klare, auch leicht opaleszente Lösung, auf 20-25°C gebracht, zum Test einsetzen.

Bestimmung von Essigsäure in Remoulade oder Joghurt

Etwa 5 g Probe in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, ca. 50 ml bidest. Wasser hinzufügen und im Wasserbad 20 min bei 50-60°C erhitzen. Gelegentlich umschütteln. Danach auf 20-25°C abkühlen und bis zur Marke mit bidest. Wasser auffüllen. Zur Abscheidung des Fettes ca. 20 min in den Kühlschrank stellen. Lösung filtrieren, klares oder leicht trübes Filtrat, auf 20-25°C gebracht, zum Test einsetzen.

Bestimmung von Essigsäure in Fleisch-Erzeugnissen

Ca. 10 g kleingeschnittene Wurstprobe genau einwiegen und mit 80 ml Perchlorsäure (1 M) 10 min lang im Homogenisator (oder Ultra-Turrax-Gerät oder IKA-Mühle) homogenisieren, anschliessend zentrifugieren, Überstand dekantieren und filtrieren. Vom Filtrat die ersten ml verwerfen. 20 ml Filtrat im Becherglas mit Kalilauge (2 M), auf pH 10,0 einstellen (Volumen an Kalilauge messen). Zur quantitativen Fällung des gebildeten Kaliumperchlorats 20 min ins Eisbad oder in den Kühlschrank stellen; filtrieren. Klare Lösung zum Test einsetzen, ggf. verdünnen (s. Verdünnungstabelle). Bei der Berechnung Wassergehalt der Probe berücksichtigen.

Zur Berechnung des Gehalts (in g/100 g) nach der unter "Berechnung" angegebenen Formel wird die Konzentration der Probe in der Probelösung benötigt. Bei Anwendung der oben beschriebenen Vorbereitung der Proben und unter Berücksichtigung des Wassergehaltes der Probe berechnet sich die Einwaage der Probe nach:

$$\text{Einwaage}_{\text{Probe}} = \frac{a \times 1000 \times d}{(b + a \times w) \times (d + e)} \quad [\text{g/l}]$$

Hierbei sind:

a: Einwaage der Probe in g

b: Volumen Perchlorsäure in ml

d: Volumen Überstand für Neutralisation in ml

e: Volumen KOH zur Neutralisation in ml

w: Wasseranteil der Probe in (%; w/w)/100

1000: Umrechnungsfaktor g in mg

(Die Dichte des Probe-eigenen Wassers bei 20-25°C ist praktisch gleich 1 g/ml und kann bei der Berechnung unberücksichtigt bleiben.)

12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch anwendbar bei der Untersuchung von Papier, Pharmaka (z.B. Infusionslösungen, Acetylsalicylsäure-Präparate), Emulgatoren (nach alkalischer Hydrolyse) und in der Forschung bei der Analytik biologischer Proben.

Zu Probenahme, Behandlung und Stabilität der Probe s. Bergmeyer, H. U. & Möllering, H. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1569-1572, Verlag Chemie, Weinheim; Holz, G. & Bergmeyer, H. U. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1577, Verlag Chemie, Weinheim; Lundquist, F. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1581-1582, Verlag Chemie, Weinheim.

Bestimmung von Essigsäure in Fermentationsproben und Zellkulturmedien

Analysenprobe, ggf. nach Zentrifugation, zum Abstoppen enzymatischer Vorgänge 15 min in Wasserbad (80°C) stellen, dabei Zentrifugenglas verschliessen, und anschliessend zentrifugieren. Überstand, ggf. gemäss Verdünnungstabelle verdünnt, zur Bestimmung einsetzen. (Alternativ kann auch eine Enteiuweissung mit Perchlorsäure erfolgen. Siehe die oben beschriebenen Anwendungsbeispiele.)

Gallertartige Agar-Medien mit Wasser homogenisieren und wie oben beschrieben weiterbehandeln.

Literatur

- 1.1 Bergmeyer, H. U. & Möllering, H. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1566-1574; Verlag Chemie, Weinheim, und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 3, p. 1520-1528, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc. New York and London
- 1.2 Bergmeyer, H. U. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 1, S. 119-125; Verlag Chemie, Weinheim und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 1, p. 112-117, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc. New York and London
- 1.3 Beutler, H.-O. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 639-645, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- 2.1 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Essigsäure (Acetat) in Fleischerzeugnissen, 07.00-14 (November 1981); Bestimmung von Essigsäure (Acetat) in Wurstwaren, 08.00-16 (November 1981); Bestimmung der Essigsäure in Tomatenketchup und vergleichbaren Erzeugnissen, 52.01.01-16 (November 1983); Bestimmung von Essigsäure (Acetat) in Brot einschliesslich Kleingebäck aus Brotteigen, 17.00-16 (Juni 1990)
- 2.2 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau, **77**, 13-14
- 2.3 Brautechnische Analysenmethoden, Band III, S. 568-572 (1982), Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising
- 2.4 Niederlande: Warenwet, Uitvoeringsvoorschriften (C II-6), Regeling Onderzoekingsmethoden voor brood; Methode 16: De Bepaling van Calciumacetat (Oktober 1986); Dit voorschrift betreft een methode voor de bepaling van calciumacetat in het in brood verwerkte meel
- 2.5 Deutsche Norm DIN EN ISO 11213 (April 1995) Modifizierte Stärke - Bestimmung des Acetylgehaltes - Enzymatisches Verfahren (ISO 11213:1995) Deutsche Fassung EN ISO 11213:1995 Modified Starch - Determination of acetyl content - Enzymatic method
- 2.6 European Standard EN ISO 11213 (April 1995) Modified Starch - Determination of acetyl content - Enzymatic method.
- 2.7 International Federation of Fruit Juice Producers (IFU, Methods of Analysis, no. 66-1996)
- 2.8 Deutsche Norm DIN EN 12632 (April 1999) Frucht- und Gemüsesäfte; Enzymatische Bestimmung des Gehaltes an Essigsäure (Acetat); Spektralphotometrische Bestimmung von NAD
- 2.9 Europäische Norm /European Standard EN 12632 (April 1999), Frucht- und Gemüsesäfte: Enzymatische Bestimmung des Gehaltes an Essigsäure (Acetat) - Spektralphotometrische Bestimmung von NAD (Fruit and vegetable juices - Enzymatic determination of acetic acid (acetate) content - NAD spectrometric method)
- 2.10 Deutsche Norm DIN 10 370 (Juni 1998) Material zur Herstellung von Umhüllungen für Zigarettenfilter, Zigaretten und andere Tabakerzeugnisse, Bestimmung des Acetatgehaltes
- 3.1 Junge, Ch. & Spadinger, Ch. (1979) Die flüchtigen Säuren des Weines, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **75**, 12-15
- 3.2 Müller, H. & Horbach, A. (1981) Bestimmung von Acetylendgruppen in Poly-ε-caprolactam durch Hydrolyse und enzymatische Essigsäure-Analyse, Die Angewandte Makromolekulare Chemie **96**, 37-41
- 3.3 Spicher, G. & Rabe, E. (1981) Die Mikroflora des Sauerteiges; XII. Mitteilung: Der Einfluss der Temperatur auf die Lactat-/Acetatbildung in mit homofermentativen Milchsäurebakterien angestellten Sauerteigen, Z. Lebensm. Unters. Forsch. **172**, 20-25
- 3.4 Piendl, A. & Wagner, I. (1983) Physiologische Eigenschaften der organischen Säuren des Bieres; I. Acetat, Brauindustrie **68**, 862-866
- 3.5 Klopper, W. J., Angelino, S.A.G.F., Tuning, B. & Vermeire, H.A. (1986) Organic acids and glycerol in beer, J. Inst. Brew. **92**, 225-228
- 3.6 Saalfeld, U. & Freund, W. (1999) Charakterisierung pulverisierter Sauerteige und Möglichkeiten ihrer qualitativen Bestimmung im Brot - Teil II: Untersuchung der Acetat-, Lactose-, Hexanal-, Calcium-, Kalium- und Natriumgehalte und der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **95**, 297-304

Essigsäure-Testkontroll-Lösung (Flasche 5)

Konzentration: siehe Flaschenetikett

Essigsäure-Testkontroll-Lösung ist eine stabilisierte wässrige Lösung von Essigsäure. Sie dient als Testkontroll-Lösung für die enzymatische Bestimmung von Essigsäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien.

Anwendung:

1. Zusatz der Essigsäure-Testkontroll-Lösung zum Testansatz:

Die Testkontroll-Lösung wird anstelle der Probelösung zur Bestimmung eingesetzt.

2. "Quantitativer Nachstart":

Nach Ablauf der Reaktion mit Probelösung und Messung von E_2 werden 0,050 ml der Testkontroll-Lösung zum Probeansatz gegeben. Nach Ablauf der Reaktion (ca. 20 min) wird die Extinktion E_3 gemessen. Es wird eine Extinktionszunahme beobachtet.

Wegen der vorgeschalteten Gleichgewichtsreaktion mit L-MDH (3) ist eine Berechnung von Ergebnissen nicht möglich.

3. Interner Standard:

Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung (keine groben Fehler bei Testansatz; Probe ist frei von Hemmstoffen) kann die Testkontroll-Lösung als interner Standard verwendet werden.

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe	Standard	Probe + Standard
Lösung 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Lösung 2	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml
Probelösung	-	0,100 ml	-	0,050 ml
Testkontroll-Lsg.	-	-	0,100 ml	0,050 ml
bideist. Wasser	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	1,900 ml

mischen, Extinktionen der Lösungen messen (E_0). Weiter verfahren wie im Arbeitsschema bei "Bestimmungsansatz" angegeben. Die entsprechenden Fussnoten und "Hinweise zur Testdurchführung" sind zu beachten.

Die Wiederfindung des Standards berechnet sich nach:

$$\text{Wiederfindung} = \frac{2 \times \Delta E_{\text{Probe + Standard}} - \Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}} \times 100 [\%]$$



R-BIOPHARM AG
An der neuen Bergstraße 17
D-64297 Darmstadt
Telefon + 49 61 51 / 81 02-0
Fax + 49 61 51 / 81 02-20
www.r-biopharm.com

