

L-Ascorbinsäure

Farb-Test

zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien

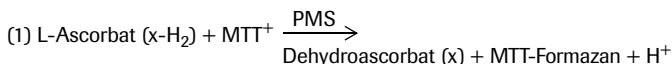
Bestimmung von Iso-ascorbinsäure: s. unter Pkt. 3 und 13

Best. Nr. 10 409 677 035

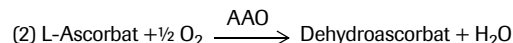
Test-Combination für 21 Bestimmungen

Prinzip (Lit. 1)

L-Ascorbinsäure (L-Ascorbat) und einige weitere reduzierende Substanzen (x-H) reduzieren das Tetrazoliumsalz MTT [3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] in Gegenwart des Elektronenüberträgers PMS (5-Methylphenaziniummethosulfat) bei pH 3,5 zu einem Formazan. Im Probeansatz wird die Summe der reduzierenden Substanzen gemessen (1).



Zur spezifischen Bestimmung von L-Ascorbinsäure wird in einem Probeleerwert-Ansatz von diesen reduzierenden Substanzen nur der L-Ascorbat-Anteil in der Probe durch Ascorbat-Oxidase (AAO) in Gegenwart von Luft-Sauerstoff oxidativ entfernt (2). Das entstehende Dehydroascorbat reagiert nicht mit MTT/PMS.



Die Extinktionsdifferenz der Probe abzüglich der Extinktionsdifferenz des Probe-Leerwertes ist der L-Ascorbat-Menge in der Probe äquivalent. Das MTT-Formazan ist Messgröße und aufgrund seiner Absorption im sichtbaren Bereich bei 578 nm zu bestimmen.

Die Test-Combination enthält

1. Flasche 1 mit ca. 43 ml Lösung, zusammengesetzt aus:
Natriumphosphat/Citrat-Puffer, pH ca. 3,5; MTT
2. Röhrchen 2 mit ca. 20 Ascorbat-Oxidase-Spateln mit je ca. 17 U AAO
3. Flasche 3 mit ca. 4 ml PMS-Lösung

Herstellung der Lösungen

1. Inhalt der Flasche 1 unverdünnt verwenden.
2. Spatel aus Röhrchen 2 unverändert verwenden.
3. Inhalt der Flasche 3 unverdünnt verwenden.

Stabilität der Reagenzien

Lösung 1 ist stabil bei 2-8°C, dunkel gelagert (s. Packungsetikett). Die Farbe des Reagenz ist zum Zeitpunkt der Produktion hellgelb, und verschiebt sich im Laufe der Laufzeit in Richtung Oliven-grün. Aber diese Farbe wird in der Test Durchführung als E1 gemessen und in der Berechnung abgezogen, sodass die Ergebnisse nicht beeinträchtigt sind.

Lösung 1 vor Gebrauch auf 37°C bringen.

Inhalt des Röhrchens 2 ist bei 20-25°C haltbar (s. Packungsetikett).

Lösung 3 ist bei 2-8°C, dunkel gelagert, haltbar (s. Packungsetikett) (eine leichte Rotfärbung hat keinen Einfluss auf die Richtigkeit des Analysenergebnisses).

Bestimmungsansatz

Wellenlänge: (Hg) 578 nm
Glasküvette¹: 1,00 cm Schichtdicke
Temperatur: 37°C

Testvolumen: 2,700 ml

Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette), gegen Wasser oder Probe-Leerwert²

Probelösung: 0,5-20 µg L-Ascorbinsäure/Testansatz³ (in 0,100-1,600 ml Probevolumen, s. auch Hinweise)

Für jede Probe ist ein Probeleerwert-Ansatz auszuführen.

1 Anstelle von Glasküvetten sind ggf. handelsübliche Einweg-Küvetten geeignet.

2 Z. B. bei Verwendung eines Zweistrahlphotometers

3 S. Hinweise zur Testdurchführung

4 Bei Verwendung von Wasser Bestimmung unmittelbar nach dem Verdünnen durchführen. Zur Stabilisierung Probe gegebenenfalls verdünnen mit meta-Phosphorsäure, z.B. E.Merck, Darmstadt, Art.Nr. 546, 1,5% (w/w); pH-Wert mit KOH (10 M) auf 3,5-4,0 eingestellt.

BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik

Nur zur Verwendung in der Lebensmittelhygiene.

Lagern bei 2-8°C

Methoden-Empfehlungen siehe unter Literatur (2)

In Küvetten pipettieren	Probe-Leerwert	Probe
Lösung 1 (auf 37°C erwärmt)	1,000 ml	1,000 ml
bidest. Wasser	1,500 ml	1,500 ml
Probelösung*	0,100 ml	0,100 ml
Röhrchen 2 (AAO-Spatel)**	1 Stück	-
mischen,**** 6 min bei 37°C inkubieren. Währenddessen Inhalt der Probeleerwert-Küvette mit AAO-Spatel alle 2 min ca. 5 s lang mischen (s. Pkt. 2.4.). Nach Entfernen des AAO-Spatels** Extinktionen von Probe-Leerwert und Probe messen (E ₁). Reaktion starten durch Zugabe von		
Lösung 3***	0,100 ml	0,100 ml
mischen,**** Lösungen bei 37°C 15 min stehen lassen, Extinktionen von Probe-Leerwert und Probe unmittelbar nacheinander messen (E ₂); s. Pkt. 2.5 und 2.6.		

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

** Spatel nur einmal verwenden

*** Das Reaktionssystem ist nach Zugabe von Lösung 3 (MTT) lichtempfindlich. Die Küvetten sollten nicht im Licht stehen.

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

Für Probe und Probe-Leerwert Extinktionsdifferenzen (E₂-E₁) berechnen. Extinktionsdifferenz des Probe-Leerwertes von Extinktionsdifferenz der Probe abziehen.

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Probe-Leerwert}}$$

Die gemessene 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

Die Berechnung erfolgt mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von MTT-Formazan.

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

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

v = Probevolumen [ml]

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

d = Schichtdicke [cm]

ϵ = Extinktionskoeffizient von MTT-Formazan bei 578 nm
= 16,9 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]

Hieraus ergibt sich für L-Ascorbinsäure:

$$c = \frac{2,700 \times 176,13}{16,9 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E = 0,2814 \times \Delta E \text{ [g L-Ascorbinsäure/l Probelösung]}$$

Ist bei der Vorbereitung der Probe 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 Probe eingewägt werden, wird das Analysenergebnis auf die Einwaage bezogen:

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

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Menge an L-Ascorbinsäure zwischen 0,5 µg und 20 µg betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit zu verdünnen, dass die L-Ascorbinsäure-Konzentration zwischen 0,03 und 0,20 g/l liegt.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge L-Ascorbinsäure im Liter	Verdünnung mit Wasser ^a	Verdünnungsfaktor F
< 0,20 g	-	1
0,20-2,0 g	1 + 9	10
2,0-20 g	1 + 99	100
> 20 g	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 1,600 ml zu erhöhen (Probelösung auf pH 3,5-4,0 einstellen!). In diesem Fall ist das Volumen der hinzuzufügenden Wassermenge entsprechend zu verringern. Das geänderte Probevolumen v ist in der Berechnungsformel entsprechend zu berücksichtigen.

2. Technische Hinweise

- Um die Stabilität der Lösung 1 (Puffer/MTT) zu gewährleisten, wird empfohlen, nur die unmittelbar benötigte Menge aus Flasche 1 zu entnehmen und auf 37°C zu temperieren.
- Um bei Serienmessungen Pipettierschritte einzusparen, kann aus Lösung 1 und Wasser ein Gemisch aus 2 Teilen Lösung 1 und 3 Teilen Wasser hergestellt werden.
- Inkubation mit AAO bei 37°C kann erfolgen:
 - in temperierbaren Küvettenhalter des Photometers,
 - in einem Küvettenhalter oder Aluminiumblock im Wasserbad,
 - notfalls auch in einem Wärmeschrank.Während der Inkubation verbleibt der Spatel in der Küvette.
- In der Probeerwert-Küvette muss "ausreichend" mit dem Ascorbat-Oxidase-Spatel gemischt werden. Dabei muss Luft eingerührt und die Ascorbat-Oxidase aus dem Spatel herausgewaschen werden. Wird zu wenig umgerührt, erhält man falsche, d.h. zu niedrige Ergebnisse.
- Nach Zugabe von PMS (Lösung 3) ist das Reaktionssystem lichtempfindlich (Tages- und Kunstlicht). Die anschließende Inkubation (15 min bei 37°C) muss im Dunkeln erfolgen:
 - Bei Inkubation im Photometer Küvettenraum des Photometers und Lichtweg schliessen.
 - Im Wasserbad (Aluminium-Block) Küvetten abdecken.
 - Im abgedunkelten Wärmeschrank aufbewahren.Lichteinfluss verursacht eine unkontrollierte "Schleichreaktion". Wenn Probe- und Probeerwert-Küvette dem Licht gleich lang ausgesetzt sind, laufen "Probe- und Leerwertreaktion" parallel, so dass sich durch Messung der Extinktionen E_2 von Probe-Leerwert und Probe unmittelbar nacheinander eine "Schleichextrapolation" erübrigt.
- Treten unter Lichtausschluss trotzdem Schleichreaktionen auf, werden diese durch die Probe verursacht. Da Probe- und Probeerwert-Küvette gleiche Probevolumina enthalten, sind die "Schleichreaktionen" identisch. Auf eine Extrapolation kann in diesem Fall verzichtet werden. Es ist jedoch darauf zu achten, dass die Extinktionen E_2 von Probe-Leerwert und Probe unmittelbar nacheinander abgelesen werden.

Wichtiger Hinweis

In der Regel ist bei der Analyse einer L-Ascorbinsäure-Testkontroll-Lösung eine Extinktionsdifferenz ($E_2 - E_1$)_{Probeerwert} von < 0,020 Extinktionseinheiten ein sehr guter Hinweis auf

- einwandfreie Lagerung von Lösung 3 (PMS) im Dunkeln. Bei der Entnahme der Lösung 3 ist diese nicht dem direkten Sonnenlicht oder künstlichem Licht ausgesetzt worden.**
 - ausreichendes Mischen mit dem AAO-Spatel (s. Pkt. 2.4).**
 - weitestgehenden Lichtausschluss der Küvetten nach Zugabe von Lösung 3 (INT) (s. Pkt. 2.5).**
- 2.7 Eine wässrige L-Ascorbinsäurelösung, z. B. als Arbeitsstandard, ist instabil. Es empfiehlt sich deshalb, die L-Ascorbinsäure mit meta-Phosphorsäure (1,5% w/v; pH mit KOH, ca. 10 M, auf 3,5-4,0 eingestellt) aufzulösen. Zur Stabilisierung keine Oxalat-Lösungen verwenden; die Ascorbat-Oxidase wird durch Oxalat gehemmt.

2.8 Zum Verdünnen von Probelösungen kann Wasser verwendet werden, jedoch nur, wenn die Messung unmittelbar nach dem Verdünnen erfolgt. Problemloser ist die Verdünnung mit meta-Phosphorsäure (s. 2.7). Man erreicht damit eine Stabilisierung der L-Ascorbinsäure in der Probelösung; meist erübrigt sich dadurch auch die pH-Einstellung der einzelnen Proben auf 3,5 bis 4,0.

2.9 Bei der Berechnung ist eindeutig anzugeben, ob die Ergebnisse als L-Ascorbinsäure (Molmasse 176,13 g/Mol) oder als L-Ascorbat (Molmasse 175,12 g/Mol) angegeben werden. (Bei der enzymatischen Bestimmung wird das L-Ascorbat-Ion gemessen.)

2.10 L-Ascorbylpalmitat kann mit dem Verfahren nicht gemessen werden, da zur Hydrolyse alkalische Bedingungen erforderlich sind, bei denen freigesetzte L-Ascorbinsäure spontan zerstört wird.

3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

Unter den angegebenen Reaktionsbedingungen ist die Bestimmung spezifisch für L-Ascorbinsäure. Lediglich D-Arabo-ascorbinsäure (Iso-ascorbinsäure) wird miterfasst (s. Pkt. 13), wenn auch mit reduzierter Geschwindigkeit.

Mit frisch hergestellter L-Ascorbinsäure, luft- und feuchtigkeitsdicht verschlossen, werden Ergebnisse von 94-100% erhalten. (Die Qualität der Ergebnisse ist stark abhängig vom Alter des L-Ascorbinsäure-Präparats, vom Lösungsmittel (m-Phosphorsäure, 1,5% (w/v); pH 3,5-4), den Aufbewahrungsbedingungen von L-Ascorbinsäure und deren Lösungen, sowie der Arbeitstechnik bei der analytischen Bestimmung. (Insbesondere muss dem Mischen mit dem AAO-Spatel und dem Licht-Ausschluss nach PMS-Zugabe besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden; die Extinktionsdifferenz des Probeerwertes sollte klein (z.B. < 0,020) sein.)

Bei der Beurteilung von Ergebnissen aus Wiederfindungsversuchen muss die Instabilität von L-Ascorbinsäure, insbesondere bei Anwesenheit von Schwermetall-Ionen wie z. B. von Eisen und Kupfer und von Sauerstoff in der Probe, berücksichtigt werden. Ergebnisse von unter 100% bedeuten nicht unbedingt unvollständige Umsetzung bei der Bestimmung, sondern sind meist ein Hinweis auf den Verlust an L-Ascorbinsäure in Probe oder Probe-lösung.

Ascorbylpalmitat wird nicht umgesetzt. Eine Bestimmung von Ascorbat nach alkalischer Hydrolyse ist nicht sinnvoll, da unter den Hydrolyse-Bedingungen Ascorbat zerstört wird.

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 $v = 1,600$ ml einer L-Ascorbinsäure-Konzentration von ca. 0,1 mg/l Probelösung (bei $v = 0,100$ ml entsprechend 1,4 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von ca. 0,3 mg/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,015 und dem maximalen Probevolumen $v = 1,600$ ml.

5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von 0,5 µg L-Ascorbinsäure/Ansatz (0,3 mg L-Ascorbinsäure/l Probelösung; Probevolumen $v = 1,600$ ml) bis 20 µg L-Ascorbinsäure/Ansatz (0,2 g L-Ascorbinsäure/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 einer L-Ascorbinsäure-Konzentration von ca. 1,5-3 mg/l. (Ist bei der Vorbereitung der Probe 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:

$x = 0,059$ g/l	VK = 2,4 %	$n = 15$	in der Serie
$x = 0,192$ g/l	VK = 1,8 %	$n = 15$	in der Serie
$x = 0,380$ g/l	VK = 1,2 %	$n = 15$	in der Serie
$x = 0,059$ g/l	VK = 3,8 %	$n = 15$	von Tag zu Tag
$x = 0,192$ g/l	VK = 2,2 %	$n = 15$	von Tag zu Tag
$x = 0,380$ g/l	VK = 2,0 %	$n = 15$	von Tag zu Tag (Lit. 1.1)

7. Störungen

Die in Lebensmitteln üblichen Zucker stören den Test nicht bis zu einer Menge von 30 mg/Ansatz.

Von den Zuckeralkoholen stört nur D-Sorbit in einer Menge ab 20 mg/Ansatz durch Hemmung der Ascorbat-Oxidase.

In gleicher Weise hemmen Alkohole in hohen Konzentrationen (z. B. >100 mg Ethanol/Ansatz) die Ascorbat-Oxidase. Durch Verlängerung der Reaktionsdauer bei Inkubation mit AAO auf 10 min können die meisten Störungen ausgeschaltet werden.

Grössere Mengen Schwefeldioxid (> 50 µg SO₂/Ansatz) reagieren mit MTT und PMS und können eine Schleichreaktion hervorrufen. Bei Verdacht einer Anwesenheit von SO₂ empfiehlt sich die Entfernung, wie unter Punkt 11 "Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Wein" beschrieben.

Metall-Ionen werden im Testsystem hinreichend komplexiert. Grössere Konzentrationen (> 100 µg/Ansatz) können jedoch die Ascorbat-Oxidase hemmen.

Nitrit-Ionen stören zwar den Test nicht; ihre Anwesenheit führt jedoch zu einer spontanen Zersetzung von L-Ascorbinsäure.

Oxalat-Ionen hemmen bereits ab einer Konzentration von 30 µg/Ansatz deutlich die Ascorbat-Oxidase. Höhere Oxalat-Konzentrationen sollten mit einem geringen Überschuss von Ca-Ionen in schwach saurem Milieu (pH 5-6) aus der Probe entfernt werden.

8. Erkennen von Störungen des Tests

8.1 Ist die Umsetzung von L-Ascorbinsäure 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 L-Ascorbinsäure (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 L-Ascorbinsäure sind keine gefährlichen Stoffe oder Zubereitungen im Sinne der Gefahrstoffverordnung, des Chemikaliengesetzes oder der EG-Richtlinie 67/548/EWG und deren Änderungs- und Anpassungsrichtlinien. Die beim Umgang mit Chemikalien üblichen Vorsichtsmassnahmen sollten jedoch beachtet werden.

Nach Gebrauch können die Reagenzien unter Beachtung der örtlichen Vorschriften zum Abwasser gegeben werden. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

10. Allgemeine Hinweise zur Vorbereitung der Proben

Flüssige, klare, farblose oder gefärbte und Proben direkt, nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle oder mit einem Probevolumen bis 1,600 ml zum Test einsetzen;

trübe Lösung filtrieren;

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

sehr stark gefärbte Proben, die unverdünnt oder mit einem höheren Probevolumen zum Test eingesetzt werden, mit Polyvinylpyrrolidon, PVPP (z.B. 1 g/100 ml) behandeln;

feste und halbfeste Proben zerkleinern oder homogenisieren, mit meta-Phosphorsäure⁴ extrahieren bzw. lösen, wenn nötig filtrieren;

Protein-haltige Proben mit meta-Phosphorsäure (15% w/v) enteiweissen, mit Kalilauge (2 M) auf pH 3,5-4 einstellen, mit Wasser verdünnen, bis die Konzentration von meta-Phosphorsäure etwa 1,5% (w/v) beträgt;

Fett-haltige Proben mit wässriger Lösung von meta-Phosphorsäure⁴ extrahieren (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.

Wichtiger Hinweis

Die Carez-Klärung kann bei der Vorbereitung der Proben zur L-Ascorbinsäure-Bestimmung wegen zu geringer Wiederfindungsrate nicht angewendet werden.

11. Anwendungsbeispiele

Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Fruchtsäften, Gemüsesäften und Getränken

Klare, helle Säfte nach Einstellen auf pH 3,5-4,0 je nach L-Ascorbinsäuregehalt mit Wasser oder meta-Phosphorsäure⁴ verdünnen (siehe Verdünnungstabelle) und zum Test einsetzen (s. Pkt. 2.8).

Dunkle Säfte zur Entfärbung mit 1% Polyvinylpyrrolidon (PVPP) (z. B. 10 ml Saft, pH 3,5-4,0, + ca. 100 mg PVPP) 1 min lang rühren und filtrieren; die meist klare Lösung zum Test einsetzen. Bei Verdünnen ist eine Entfärbung oft entbehrlich.

Trübe Säfte filtrieren.

Bestimmung von L-Ascorbinsäure in alkoholhaltigen Getränken

Wein

Wein auf pH 3,5-4,0 einstellen und mit Wasser oder meta-Phosphorsäure⁴ auf geeignete L-Ascorbinsäure-Konzentration einstellen (siehe Verdünnungstabelle). Entfärbung von Rotwein ist nicht erforderlich.

Bei Anwesenheit von Schwefeldioxid (SO₂) Wein mit Formaldehyd behandeln:

10 ml Wein mit 1 Tropfen verdünnter Formalinlösung (ca. 5% Formaldehyd, w/v) versetzen, mischen und 5 min bei 20-25°C stehen lassen, auf pH 3,5-4,0 einstellen. Lösung ggf. verdünnen (siehe Verdünnungstabelle) und zum Test einsetzen.

Bei höherem Probevolumen (v = 0,200-0,500 ml) ist die Verweildauer des AAO-Spates in der Probeleerwert-Küvette auf 10 min zu erhöhen.

Bier

Etwa 10 ml Bier filtrieren oder mit einem Glasstab zur Entfernung der Kohlensäure rühren. Probe auf pH 3,5-4,0 einstellen.

Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Milch

100 ml Milch durch Zugabe von ca. 1 g Citronensäure (Monohydrat) auf pH 3,5-4,0 einstellen. Filtrieren und die ersten Anteile des Filtrats verwerfen. Die leicht opaleszente Lösung (bis zu v = 0,500 ml) sofort zum Test einsetzen.

Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Fleisch-Erzeugnissen

Probe 3 mal jeweils für 20 s homogenisieren und anschliessend 40 s warten. Ca. 4 g Homogenat mit 10 ml meta-Phosphorsäure (15% w/v) im Homogenisator 1 min lang homogenisieren (Metallteile des Geräts vor der Anwendung mit Säure reinigen, da Eisenionen den Test stören). Mischung mit Kalilauge (2 M) auf pH 3,5-4,0 einstellen, quantitativ in einen 100 ml-Messkolben geben, mit Wasser nachspülen und bis zur Marke auffüllen. Mischen, zur Fettabscheidung 15 min bei 2-8°C halten, anschliessend filtrieren oder zentrifugieren (ca. 3000-5000 U/min). Überstehende Lösung, ggf. verdünnen, zum Test einsetzen.

Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Kartoffeln

Ca. 50 g Kartoffeln mit 50 ml meta-Phosphorsäure (15% w/v) und 0,1 ml n-Octanol in einem Haushaltsmixer zerkleinern (ca. 1 min).

Mit Kalilauge (2 M) auf pH 3,5-4,0 einstellen. Mischung quantitativ in einen 500 ml-Messkolben mit Wasser überspülen, bis zur Marke auffüllen und mischen. Filtrieren und 0,500 ml der Probelösung zum Test einsetzen.

Probe-Leerwert im Test 15 min lang mit AAO-Spatel inkubieren. Bei der Berechnung geändertes Probevolumen berücksichtigen.

Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Mehl

Ca. 20 g Mehl in einen Erlenmeyer-Kolben genau einwiegen und mit 100 ml meta-Phosphorsäure⁴ versetzen. Schütteln bis eine gleichmässige Verteilung erreicht ist. Filtrieren und klare Lösung (bis zu v = 1,500 ml) sofort zum Test einsetzen.

Es wird empfohlen, Vorbereitung der Probe und Durchführung der Bestimmung sehr rasch auszuführen, da es zu Trübungen im Testansatz kommen kann (Ausfällung von Stärke).

12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch anwendbar bei der Untersuchung von Pharmaka (z. B. Vitamintabletten und -Lösungen, Analgetika, Antipyretika, Lit. 3.2-3.4), sowie in der Forschung bei der Analytik biologischer Proben.

Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Vitamintabletten

Vitamin C-haltige Tabletten mit meta-Phosphorsäure⁴ lösen, Lösung gemäss Verdünnungstabelle verdünnen und zum Test einsetzen.

Wichtiger Hinweis

Wenn L-Ascorbat in Proben, die auch Schwermetalle enthalten (z. B. Kupfer und Eisen in Pharmaka oder Tierfutter-Zusätzen), bestimmt werden soll, dann darf die Probelösung erst unmittelbar vor dem Pipettieren in den Testansatz hergestellt werden, da sonst die gefundenen Ergebnisse zu niedrig sind (L-Ascorbinsäure ist in Anwesenheit von Metall-Ionen höchst instabil).

13. Bestimmung von Iso-Ascorbinsäure in Fleisch-Erzeugnissen

Iso-Ascorbinsäure wird bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure, wenn auch mit verminderter Geschwindigkeit, ebenfalls erfasst (s.Pkt. 3).

Die **Vorbereitung** von Fleisch-Erzeugnissen erfolgt wie in Pkt. 11 beschrieben. Je nach Iso-Ascorbinsäure-Konzentration in der Probelösung werden 0,500 bis 1,000 ml Filtrat bzw. Überstand zum Test eingesetzt.

Im **Bestimmungsansatz** wird ca. 20 min bei 37°C inkubiert (anstelle 6 min bei der Bestimmung von L-Ascorbinsäure). In dieser Zeit wird der Inhalt der Leerwertküvette in Abständen von ca. 3 min jeweils 5 s lang gemischt.

L-Ascorbinsäure-Testkontroll-Lösung

Die Testkontroll-Lösung dient zur Kontrolle für die enzymatische Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien.

Reagenzien

L-Ascorbinsäure (Vitamin C), p. A.
meta-Phosphorsäure (z.B. Merck Darmstadt, Art.Nr. 546), 1,5% (w/v); pH-Wert mit KOH (10 M) auf 3,5-4,0 eingestellt

Herstellung der Testkontroll-Lösung

200 mg L-Ascorbinsäure auf 0,1 mg genau einwiegen und im Messkolben mit meta-Phosphorsäure auf 100 ml auffüllen und gründlich mischen. Lösung 1:10 (1+9) im Messkolben mit meta-Phosphorsäure verdünnen; mischen.

Die Lösung ist bei 20°C 1 Tag, bei 2-8°C 3 Tage und bei -15 bis -25°C 1 Woche haltbar.

Anwendung:

1. Zusatz der L-Ascorbinsäure-Testkontroll-Lösung zum Testansatz:

Die Testkontroll-Lösung wird anstelle der Probelösung zur Bestimmung eingesetzt. (Die Messung der Testkontroll-Lösung ist nicht erforderlich zur Berechnung der Ergebnisse.) (Zu Wiederfindung s. Pkt. 3)

2. "Quantitativer Nachstart":

Nach Ablauf der Reaktion mit Probelösung und Messung von E₂ werden 0,050 ml der Testkontroll-Lösung zum Probeansatz gegeben. Nach Ablauf der Reaktion (ca. 15 min) wird die Extinktion E₃ gemessen. Aus der Differenz (E₃-E₂) wird nach der allgemeinen Berechnungsformel die Konzentration berechnet. Hierbei ist das geänderte Gesamtvolumen zu berücksichtigen. Wegen der Verdünnung des Testansatzes durch die Zugabe der Testkontroll-Lösung weicht das Ergebnis geringfügig von dem Ergebnis ab, das gemäss Pkt. 1 ermittelt wurde.

Literatur

- 1.1 Deneke, U., Michal, G. & Beutler, H.-O. (1978) Neue Methode zur Bestimmung von Vitamin C in Lebensmitteln, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **74**, 400-403
- 1.2 Beutler, H.-O. & Beinstingl, G. (1980) Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Lebensmitteln, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **76**, 69-75
- 1.3 Beutler, H.-O. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 376-385, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- 2.1 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau **77**, 8-9
- 2.2 Brautechnische Analysenmethoden, Band III, S. 559-562 (1982), Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising
- 3.1 Hughes, R. E., Hurley, R. J. & Jones, P. R. (1971) Vitamin C activity of D-Araboascorbic Acid, Nutrition Reports International **4**, 177-183
- 3.2 Henniger, G. (1981) Enzymatische Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Lebensmitteln, Pharmazeutika und biologischen Flüssigkeiten, alimenta **20**, 12-14
- 3.3 Henniger, G. & Hoch, H. (1981) Enzymatische Substratbestimmungen in der pharmazeutischen Analytik, dargestellt an den Bestimmungen von L-Ascorbinsäure, Ethanol und Lactose, Deutsche Apothekerzeitung **121**, 643-649
- 3.4 Gliniecki, K., Hagemann, U., Kuhne, W. & Lander, C. (1982) Hagebutten-Bestimmung des Vitamin C-Gehaltes, Pharm. Zeitung **127**, 823-826
- 3.5 Dietz, E., Witthöft, C. & Bitsch, I. (1996) Die relative Bioverfügbarkeit der Ascorbinsäure des Sanddornsafte für den Menschen, Lebensmittelchemie **50**, 17 (1996)

3. Interner Standard:

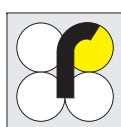
Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung (keine groben Fehler bei Testansatz; Probe ist frei von Hemmsubstanzen) kann die Testkontroll-Lösung als interner Standard verwendet werden:

In Küvetten pipettieren	Probe-Leerwert Probe	Probe	Probe-Leerwert Standard	Standard	Probe-Leerwert Probe + Standard	Probe + Standard
Lösung 1 (37°C) bidest. Wasser	1,000 ml 1,500 ml	1,000 ml 1,500 ml	1,000 ml 1,500 ml	1,000 ml 1,500 ml	1,000 ml 1,500 ml	1,000 ml 1,500 ml
Probelösung	0,100 ml	0,100 ml	-	-	0,050 ml	0,050 ml
Testkontroll-Lsg.	-	-	0,100 ml	0,100 ml	0,050 ml	0,050 ml
Röhrchen 2 (AAO-Spatel)	1 Stück	-	1 Stück	-	1 Stück	-

mischen, 6 min bei 37°C inkubieren. 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

