

D-Milchsäure (D-Lactat)/ L-Milchsäure (L-Lactat)

UV-Test

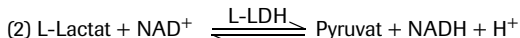
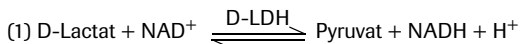
zur Bestimmung von D-Milchsäure und L-Milchsäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien

Best. Nr. 11 112 821 035

Test-Combination für je 30 Bestimmungen

Prinzip (Lit. 1)

D-Milchsäure (D-Lactat) wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart von D-Lactat-Dehydrogenase (D-LDH) zu Pyruvat oxidiert. Zur Oxidation von L-Milchsäure benötigt man das Enzym L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH) (1, 2).



Das Gleichgewicht dieser Reaktionen liegt auf der Seite von Lactat. Es kann durch Abfangen des Pyruvats mit Hilfe der nachgeschalteten Reaktion mit dem Enzym Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) in Gegenwart von L-Glutamat auf die Seite von Pyruvat und NADH verschoben werden (3).



Die während der Reaktion (1) bzw. (2) gebildete NADH-Menge ist der D-Milchsäure- bzw. L-Milchsäure-Menge äquivalent. NADH ist Messgröße und aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm zu bestimmen.

Die Test-Combination enthält

- Flasche 1 mit ca. 30 ml Lösung, zusammengesetzt aus: Glycylglycinpuffer, pH ca. 10,0; L-Glutaminsäure, ca. 440 mg
- Flasche 2 mit ca. 210 mg NAD-Lyophilisat
- Flasche 3 mit ca. 0,7 ml Glutamat-Pyruvat-Transaminase-Suspension, ca. 1100 U
- Flasche 4 mit ca. 0,7 ml D-Lactat-Dehydrogenase-Lösung, ca. 3800 U
- Flasche 5 mit ca. 0,7 ml L-Lactat-Dehydrogenase-Lösung, ca. 3800 U
- Flasche 6 mit D-Milchsäure-Testkontroll-Lösung zur Testkontrolle (Die Messung der Testkontroll-Lösung ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen.) Testkontroll-Lösung unverdünnt verwenden. (Verwendbar bis: s. Packungsetikett).
- Flasche 7 mit L-Milchsäure-Testkontroll-Lösung zur Testkontrolle (Die Messung der Testkontroll-Lösung ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen.) Testkontroll-Lösung unverdünnt verwenden. (Verwendbar bis: s. Packungsetikett).

Herstellung der Lösungen

- Inhalt der Flaschen 1, 3, 4 und 5 unverdünnt verwenden.
- Inhalt der Flasche 2 mit 6 ml bidest. Wasser lösen.

Stabilität der Reagenzien

Der Inhalt der Flaschen 1, 3, 4 und 5 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 3 Wochen, bei -15 bis -25°C 2 Monate haltbar.

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

2 Anstelle von Glasküvetten sind ggf. auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.

3 z. B. bei Verwendung eines Zweistrahlphotometers

4 Siehe Hinweise zur Testdurchführung

BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM
Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik

Nur zur Verwendung in der Lebensmittelhygiene.

Lagern bei 2-8°C

Methoden-Empfehlungen und standardisierte Verfahren siehe unter Literatur (2)

Bestimmungsansatz

Wellenlänge¹: 340 nm, Hg 365 nm oder 334 nm

Glasküvette²: 1,00 cm Schichtdicke

Temperatur: 20-25°C

Testvolumen: 2,240 ml (D-Milchsäure)

2,260 ml (L-Milchsäure)

Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette), gegen Wasser oder Leerwert³

Probelösung: 0,3-35 µg D- und L-Milchsäure/Ansatz⁴ (in 0,100-1,000 ml Probelösung)

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Lösung 1	1,000 ml	1,000 ml
Lösung 2	0,200 ml	0,200 ml
Suspension 3	0,020 ml	0,020 ml
Probelösung*	-	0,100 ml
bidest. Wasser	1,000 ml	0,900 ml
mischen**, nach ca. 5 min Extinktionen der Lösungen messen (E ₁), Reaktion starten durch Zugabe von		
Lösung 4	0,020 ml	0,020 ml
mischen**, nach Ablauf der Reaktion (ca. 30 min) Extinktionen von Leerwert und Probe unmittelbar nacheinander messen (E ₂) (s. Pkt. 2.4). Anschließend zugeben		
Lösung 5	0,020 ml	0,020 ml
mischen**, nach Ablauf der Reaktion (ca. 30 min) Extinktionen von Leerwert und Probe unmittelbar nacheinander messen (E ₃)		

* 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)

Für Leerwert und Probe Extinktionsdifferenzen (E₂-E₁) berechnen. Extinktionsdifferenz des Leerwertes von Extinktionsdifferenz der Probe abziehen. Man erhält ΔE_{D-Milchsäure}.

Für Leerwert und Probe Extinktionsdifferenzen (E₃-E₂) berechnen. Extinktionsdifferenz des Leerwertes von Extinktionsdifferenz der Probe abziehen. Man erhält ΔE_{L-Milchsäure}.

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

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

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

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 D-Milchsäure:

$$c = \frac{2,240 \times 90,1}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E = \frac{2,018}{\epsilon} \times \Delta E \text{ [g D-Milchsäure/l Probelösung]}$$

für L-Milchsäure:

$$c = \frac{2,260 \times 90,1}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E = \frac{2,036}{\varepsilon} \times \Delta E \text{ [g L-Milchsäure/l Probelösung]}$$

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:

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

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

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Menge an D- und L-Milchsäure zwischen 0,5 µg und 35 µg (Messung bei 365 nm) bzw. 0,3 µg und 20 µg (Messung bei 340, 334 nm) betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit zu verdünnen, dass die Milchsäurekonzentration zwischen 0,06 und 0,35 g/l bzw. 0,03 und 0,2 g/l liegt.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge D- und L-Milchsäure im Liter		Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor F
Messung bei			
340 oder 334 nm	365 nm		
< 0,2 g	< 0,35 g	-	1
0,2-2,0 g	0,35-3,5 g	1 + 9	10
2,0-20 g	3,5-35 g	1 + 99	100
> 20 g	> 35 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 1,000 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

- Handschweiss enthält L-Milchsäure. Es ist deshalb darauf zu achten, dass Pipettenspitzen und Rührspatel nicht mit den Fingern berührt werden.
- Bei der Berechnung ist eindeutig anzugeben, ob die Ergebnisse als Milchsäure (Molmasse 90,1 g/Mol) oder als Lactat (Molmasse 89,1 g/Mol) angegeben werden.
- Bei Beurteilung von Analysenergebnissen ist zu berücksichtigen, dass bei der acidimetrischen Bestimmung der "Gesamtsäure berechnet als Milchsäure" Protonen gemessen werden und bei der enzymatischen Bestimmung das Lactat-Ion. Ein direkter Vergleich der Zahlenwerte ist somit nicht möglich.
- Bei E₂ kann nach vollständiger Umsetzung von D-Milchsäure eine reagenzbedingte Schleichreaktion auftreten. Normalerweise ist eine Extrapolation der Extinktionswerte für E₂ auf den Zeitpunkt der Zugabe von Lösung 4 nicht erforderlich, wenn die Extinktionen von Leerwert und Probe unmittelbar nacheinander gemessen werden.

Tritt zusätzlich eine Probe-bedingte Schleichreaktion auf, so ist zur Berechnung von ΔE_{D-Milchsäure} E₂ durch Extrapolation auf den Zeitpunkt der Zugabe von Lösung 4 zu ermitteln.

Zur Berechnung von ΔE_{L-Milchsäure} sind der zuletzt gemessene E₂-Wert und die (ggf. auf den Zeitpunkt der Zugabe von Lösung 5 extrapolierte) Extinktion E₃ zu verwenden.

- Die Bestimmung der stereo-isomeren Formen der Milchsäure kann erfolgen

- nacheinander, wobei die Milchsäure-Form zuerst gemessen wird, die in der geringeren Konzentration in der Probelösung vorliegt. Bei der Berechnung der Ergebnisse sind dann die entsprechenden Gesamtvolumina (V) zu berücksichtigen.
- nebeneinander, d. h., in verschiedenen Ansätzen, wenn das Verhältnis L- zu D-Milchsäure, bzw. umgekehrt, grösser ist als z.B. 5:1. In diesem Fall ist die Probelösung so herzustellen, dass bei der Bestimmung eine ausreichend hohe Extinktionsdifferenz (z. B. > 0,100) gemessen wird,

um ausreichend präzise Ergebnisse zu erhalten. Alternativ kann die Probelösung verdünnt oder das Probevolumen entsprechend erhöht werden.

- Handelsübliche Milchsäure muss nicht unbedingt die stereo-isomeren Formen im Verhältnis 1:1 enthalten. Freie Milchsäure liegt zumindest teilweise als Dimeres (Lactyl-lactat) vor, das bei der enzymatischen Bestimmung nicht umgesetzt wird, so dass dieses Material nicht zur Herstellung von Standardlösungen geeignet ist. Hierfür sind die Li-thium- oder auch Calcium-Salze zu verwenden.

3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

Die Bestimmung ist spezifisch für D- und L-Milchsäure.

Bei der Analyse der Reinsubstanzen Lithium-D-lactat (Molmasse 96,0) sind Ergebnisse von ca. 99%, von Lithium-L-lactat ca. 98% zu erwarten.

4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze (Lit. 1)

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen v = 1,000 ml und Messung bei 340 nm einer Konzentration an Milchsäure von 0,15 mg/l (bei v = 0,100 ml entsprechend 1,5 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von 0,3 mg/l errechnet sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,010 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probevolumen v = 1,000 ml.

5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von 0,3 µg Milchsäure/Ansatz (0,3 mg Milchsäure/l Probelösung; Probevolumen v = 1,000 ml) bis 35 µg Milchsäure/Ansatz (0,35 g Milchsäure/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 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:

D-Milchsäure:

VK = 1,96 % Kulturmedium (Lit. 1.5)
 Joghurt: x = 0,3 g/100 g r = 0,03 g/100 g R = 0,05 g/100 g
 Milchpulver: x = 0,07 g/100 g r = 0,0008 g/100 g R = 0,003 g/100 g
 Weitere Daten: s. Literatur (Lit. 2.1)

L-Milchsäure:

VK = 2,3 % Lithium-L-Lactat-Lösung (Lit. 1.3)
 Joghurt: x = 0,6 g/100 g r = 0,05 g/100 g R = 0,07 g/100 g
 Milchpulver: x = 0,112 g/100 g r = 0,008 g/100 g R = 0,015 g/100 g
 Trockenvollei-Pulver:
 x = 240 mg/kg r = 62,8 mg/kg s_(f) = ± 22,2 mg/kg
 R = 89,1 mg/kg s_(R) = ± 31,5 mg/kg

Weitere Daten: s. Literatur

Wein: r = 0,02 + 0,07 · x_i R = 0,05 + 0,125 × x_i
 x_i = L-Milchsäure-Konzentration in g/l (Lit. 2.14, 2.15)

7. Störungen

Spuren von Glutamat-Dehydrogenase (GIDH) in GPT führen zu Reagenzien-abhängigen Schleichreaktionen. Eine Extrapolation von E₂ ist nicht erforderlich, wenn die Extinktionen von Leerwert und Probe unmittelbar nacheinander abgelesen werden und keine Probe-abhängige Schleichreaktion auftritt. Siehe auch Pkt. 2.4.

8. Erkennen von Störungen

- Ist die Umsetzung von D- bzw. L-Milchsäure nach der unter "Bestimmungsansatz" angegebenen Zeit beendet, so kann im allgemeinen auf einen störungsfreien Ablauf geschlossen werden.
- Nach Ablauf der Reaktion kann durch Zugabe von D- bzw. L-Milchsäure oder D- bzw. L-Lactat (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.
- 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 D- und L-Milchsäure 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 und annähernd neutrale Proben direkt, nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle oder mit einem Probevolumen bis 1,000 ml zum Test einsetzen;

trübe Lösungen filtrieren;

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

saure Proben mit Kalilauge oder Natronlauge auf pH 8-10 einstellen;

saure und schwach gefärbte Proben mit Kalilauge oder Natronlauge auf pH 8-10 einstellen und ca. 15 min stehen lassen;

„stärker gefärbte“ Proben (ggf. auf pH 8-10 eingestellt) gegen Probeleerwert (= Puffer bzw. bidest. Wasser + Probe) messen (Photometer mit Probeleerwert im Strahlengang auf 0,000 stellen), falls schon vor Zugabe der Lösung 4 (D-LDH) eine Schleichreaktion auftritt;

stark gefärbte Proben, die unverdünnt oder mit einem höheren Probevolumen zum Test eingesetzt werden, mit Polyvinylpyrrolidon, 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 Carrez-Reagenzien (s. u.) klären oder mit Perchlorsäure enteiuweissen;

Fett-haltige Proben mit heissem Wasser 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; alternativ nach Extraktion mit heissem Wasser mit Carrez-Reagenzien klären.

Carrez-Klärung:

Geeignete Probemenge in einem 100 ml-Messkolben genau einwiegen, ca. 60 ml bidest. Wasser hinzufügen. Flüssige Probe in einen 100 ml-Messkolben, der ca. 60 ml bidest. Wasser enthält, pipettieren. Anschliessend 5 ml Carrez-I-Lösung (Kalium-hexacyanoferrat(II) (Ferrocyano)id) 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 µM; 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 D- und L-Milchsäure in Frucht- und Gemüsesäften und ähnlichen Getränken

Trübe Säfte filtrieren und soweit verdünnen, dass die Milchsäurekonzentration etwa 0,03 bis 0,35 g/l beträgt. Die verdünnte Lösung kann zum Test eingesetzt werden, auch wenn diese leicht gefärbt ist.

Nur stark gefärbte Säfte müssen vorher entfärbt werden, wenn sie unverdünnt zum Test eingesetzt werden. In diesem Fall verfährt man wie folgt:

10 ml Saft und 0,1 g Polyamidpulver oder Polyvinylpyrrolidon (PVPP)

mischen, 1 min rühren und filtrieren. Klare, leicht gefärbte Lösung zum Test einsetzen.

Als weitere Möglichkeit der Vorbereitung der Probe ist die Carrez-Klärung anwendbar:

Ca. 1-10 g Probe in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen bzw. 1-10 ml Probe in einen 100 ml-Messkolben pipettieren, etwa 60 ml Wasser hinzufügen. Kolben umschwenken. Zur Klärung 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g Kaliumhexacyanoferrat(II), $K_4 [Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100 ml$), 5 ml Carrez-II-Lösung (7,20 g Zinksulfat, $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100 ml$) und 10 ml NaOH (0,1 M) hinzufügen, nach jeder Zugabe mischen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen, filtrieren. Klare, evtl. leicht trübe Lösung zum Test einsetzen, ggf. vorher verdünnen.

Bestimmung von freier D- und L-Milchsäure in Wein

Die Bestimmung der freien D- und L-Milchsäure in Weiss- oder Rotwein kann meist ohne Verdünnung oder Entfärbung ausgeführt werden.

Bestimmung von freier und veresterter D- und L-Milchsäure in Wein

Zur Ermittlung des Gehalts an Gesamt-D- und L-Milchsäure 20 ml Wein mit 2 ml NaOH (2 M) 15 min am Rückflusskühler erhitzen, abkühlen und mit Schwefelsäure (1 M) neutralisieren (Indikatorpapier). Lösung quantitativ in einen 50 ml-Messkolben überführen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Probelösung in üblicher Weise zum Test einsetzen.

Bei Süddeinen mit hohem Zuckergehalt Verseifung mit bidest. Wasser (15 min am Rückflusskühler erhitzen) ausführen.

Bestimmung von D- und L-Milchsäure in Bier

Etwa 5-10 ml Bier zur Entfernung der Kohlensäure filtrieren oder etwa 1 min mit einem Rührstab rühren. Die weitgehend CO_2 -freie Bierprobe direkt zum Test einsetzen.

Bestimmung von D- und L-Milchsäure in essighaltigen Flüssigkeiten

0,100 ml Weinessig oder Gurkensaft (Essiggurken) direkt zum Test einsetzen. Der hohe Anteil an Essigsäure verlangsamt den Test. Daher Stillstand der Reaktionen abwarten (30-40 min) und erst dann Extinktionen messen.

Bestimmung von D- und L-Milchsäure in Sauerkrautsaft

1,00 ml Sauerkrautsaft in 100 ml-Messkolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen. Verdünnte Lösung (1 + 99) zum Test einsetzen.

Bestimmung von D- und L-Milchsäure in Joghurt (Milch)

2 g Joghurt (Milch) mit 98 ml Wasser mischen (Mixer oder Homogenisator), filtrieren, 0,100 ml Filtrat zum Test einsetzen.

Bestimmung von D- und L-Milchsäure in Käse

Etwa 10 g Käse zerkleinern (reiben) und mischen. Etwa 1 g der Probe in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, mit ca. 80 ml Wasser 15 min bei ca. 60°C erhitzen, gelegentlich schütteln. Nach Abkühlen auf 20-25°C mit Wasser auf 100 ml auffüllen. Zur Fettscheidung Messkolben 15 min lang kühl stellen (Kühlschrank, Eisbad); Lösung filtrieren. Vom klaren Filtrat 0,100 ml (bei Hartkäse) bzw. 0,500 ml (bei Weichkäse) zum Test einsetzen.

Bestimmung von D- und L-Milchsäure in Fleisch-Erzeugnissen

Etwa 5 g homogenisierte Probe in einen Homogenisierungsbecher genau einwiegen, ca. 20 ml Perchlorsäure (1 M) hinzufügen und 10 min homogenisieren; Inhalt mit ca. 40 ml Wasser quantitativ in ein Becherglas spülen. Unter Rühren (Magnetrührer) mit Kalilauge (2 M) auf pH 10-11 einstellen. Inhalt mit Wasser quantitativ in einen 100 ml-Messkolben spülen und bis zur Marke auffüllen, wobei darauf zu achten ist, dass die Fettschicht oberhalb, die wässrige Schicht an der Marke steht. Mischung schütteln. Zur Abscheidung des Fettes und zur Ausfällung des Kaliumperchlorat-Niederschlages 20 min in den Kühlschrank stellen. Anschliessend filtrieren. Die ersten ml verwerfen. Klare, evtl. leicht trübe Lösung, ggf. nach Verdünnen, zum Test einsetzen.

12. Bestimmung von Milchsäure-Estern

(z.B. Glycerid-Milchsäureester, Emulgatoren)

In Monoglycerid- bzw. Diglycerid-Milchsäureestern gebundene Milchsäure kann auch neben freier Milchsäure (Lactat) bestimmt werden, indem die Probe mit Chloroform extrahiert und anschliessend die Ester mit Kalilauge verseift werden. Hierzu wie folgt verfahren:

Zerkleinerte und homogenisierte Probe, welche bis zu etwa 200 mg Monoglycerid-Milchsäureester (z.B. Monooleyl-lactylglyceridester, MG ca. 445) oder bis zu 250 mg Diglycerid-Milchsäureester (z. B. Dioleyl-lactylglyceridester, MG ca. 535) enthält, im 250 ml Rundkolben mit ca. 50 ml Chloroform etwa 2 Stunden lang am Rückflusskühler beim Sieden halten.

Filtrieren und mit Chloroform nachwaschen. Chloroform am Rotationsverdampfer abdampfen. Den weitgehend bis zur Trocknung abgedampften Rückstand mit 25 ml methanolischer Kalilauge (1 M) 10 min lang am Rückflusskühler kochen. Lösung auf 20-25°C abkühlen lassen und mit ca. 5 ml Salzsäure (5 M) neutralisieren bzw. schwach ansäuern; Inhalt quantitativ in einen 100 ml-Messkolben überspülen, mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren. Weitgehend klare Lösung zum Test einsetzen. Zur

Gehaltsbestimmung ist das Molekulargewicht des Glycerides zugrunde zu legen.

13. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch anwendbar bei der Untersuchung von Kosmetika (Lit. 5.1), Papier, Pharmaka und in der Forschung bei der Analyse biologischer Proben. Zu Probenahme, Behandlung und Stabilität der Probe s. Lit. 1.3, 1.4

Bestimmung von Milchsäure in Fermentationsproben und Zellkulturmedien

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

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

Literatur

1.1 Gutmann, I. & Wahlefeld, A.W. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, 1510-1514; Verlag Chemie, Weinheim, und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1464-1468; Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London

1.2 Noll, F. (1966) Methode zur quantitativen Bestimmung von L-(+)-Lactat mittels Lactat-Dehydrogenase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase, *Biochem. Z.* **346**, 41-49

1.3 Noll, F. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1521-1525; Verlag Chemie, Weinheim, und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1475-1479; Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London

1.4 Noll, F. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 582-588, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel

1.5 Gawehn, K. & Bergmeyer, H. U. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1538-1541; Verlag Chemie, Weinheim, und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1492-1495; Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London

1.6 Gawehn, K. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 588-592, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel

2.1 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von L- und D-Milchsäure (L- und D-Lactat) in Fleischerzeugnissen, 07.00-15 (Juni 2008); Bestimmung von L- und D-Milchsäure (L- und D-Lactat) in Wurstwaren, 08.00-17 (November 1981); Bestimmung von L- und D-Milchsäure (L- und D-Lactat) in Milch und Milchprodukten, 01.00-26/1 (Januar 2011); Bestimmung von L- und D-Milchsäure (L- und D-Lactat) in Milchprodukten, 02.00-16/1 (Januar 2011); Bestimmung von L-Milchsäure, Bernsteinsäure und D-3- Hydroxybuttersäure in Ei und Eiprodukten, 05.00-2 (November 1987)

2.2 Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 61B (Enzymatische Bestimmungen)/3.3. (1981), Kapitel 1 (Milch)/5.2 (1995), Kapitel 2B (Sauermilchprodukte)/18 (1980), Kapitel 4 (Milchdauerwaren)/10.4 (1993), Kapitel 28A (Frucht- und Gemüsesäfte u.a.)/7.5 (1988), Kapitel 30A (Wein aus Trauben)/6.4 (1993), Kapitel 34 (Gärungssessig)/4.4 (1994)

2.3 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau **77**, 6-7

2.4 Brautechnische Analysemethoden, Band III, S. 572-576 (1982), Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising

2.5 Methodensammlung der Internationalen Fruchtsaft-Union (IFU-Analysen-Methode Nr. 53-1983); enthalten in "Code of Practice for Evaluation of Fruit and Vegetable Juices" (1996) edited by Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Economic Community (A.I.J.N.)

2.6 International Standard ISO 8069 (Juni 1986) Dried milk - Determination of lactic acid and lactates content - Enzymatic method

2.7 Ministero dell' Agricoltura e delle Foreste (1986) Approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi per i mosti, i vini, gli agri di vino (aceti) e i sottoprodotti della vinificazione". Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 161 del 14 Luglio 1986

2.8 Ministero dell' Agricoltura e delle Foreste (1986) Approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi per i formaggi". Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 229 del 2 ottobre 1986

2.9 Niederlande: Warenwet, Uitvoeringsvoorschriften (C II-6) Regeling Onderzoekingsmethoden voor brood; Methode 17: De Bepaling van Melkzuur (Oktober 1986); Dit voorschrift betreft een methode voor de bepaling van melkzuur (lactaten) in het in brood verwerkte meel

2.10 International Dairy Federation, International IDF Standard 69B (1987) Dried Milk, Determination of Lactic Acid and Lactates Content, Enzymatic Method

2.11 RSK-Werte, die Gesamtdarstellung, Richtwerte und Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen für Fruchtsäfte und Nektare einschliesslich überarbeiteter Analysemethoden (1987), 1. Aufl., Verlag Flüssiges Obst, D-56370 Eschborn, S. 121-125

2.12 Deutsche Norm DIN 10335 (Juni 1987) Bestimmung des Gehaltes an L- und D-Milchsäure (L- und D-Lactat) in Milch und Milchprodukten, Enzymatisches Verfahren

2.13 Council Directive of 20 June 1989 on hygiene and health problems affecting the production and the placing on the market of egg products (89/437/EEC), Official Journal No. L 212, 22/07/89 p. 0087

2.14 Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, Complément n° 1 à l'édition officielle de juin 1990, OFFICE INTERNATIONAL DELA VIGNÉ ET DU VIN, S. 179-182

2.15 Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 272 (3. Oktober 1990), Rechtsvorschriften: Verordnung (EWG) Nr. 2676/90 der Kommission vom 17. September 1990 zur Festlegung gemeinsamer Analysemethoden für den Weissektor (S. 97-100)

2.16 Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, VDLUFA (1993) Methodenbuch Band VI, C8.6

2.17 Deutsche Norm DIN EN 12631 (April 1999) Frucht- und Gemüsesäfte: Enzymatische Bestimmung des Gehaltes an D- und L-Milchsäure (Lactat)

2.18 Europäische Norm / European Standard EN 12631 (April 1999) Frucht- und Gemüsesäfte: Enzymatische Bestimmung des Gehaltes an D- und L-Milchsäure (Lactat) - Spektralphotometrische Bestimmung von NAD (Fruit and vegetable juices - Enzymatic determination of D- and L-lactic acid (lactate) content - NAD spectrometric method)

2.19 Standard der Russischen Föderation / Standard of the Russian Federation / GOSSTANDART ROSSII GOST R 51196-98 (1998) Dried milk. Method for determination of lactic acid and lactates

3.1 Duran, M., van Biervliet, J.P.G.M., Kamerling, J.P. & Wadman, S. K. (1977) D-Lactic aciduria, an inborn error of metabolism? *Clin. Chim. Acta* **74**, 297-300

3.2 Kandler, O. (1982) Gärungsmechanismen bei Milchsäurebakterien, *Forum Mikrobiologie* **5**, 16-22

3.3 Giesecke, D., Stangassinger, M. & Henle, K. (1985) D(-)-Milchsäure - ein Stoffwechselproblem, *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* **24**, 172-186

3.4 Barth, C. A. & de Vrese, M. (1984) D-Lactat im Stoffwechsel des Menschen - Fremdstoff oder physiologischer Metabolit? *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **36**, 155-161

3.5 de Vrese, M., Koppenhoefer, B. & Barth, C.A. (1990) D-Lactic acid metabolism after an oral load of DL-lactate, *Clinical Nutrition* **9**, 23-28

3.6 Bässler, K.H. (1988) Die physiologische Rolle von Laktat im Licht neuerer Erkenntnisse, *Ernährungs-Umschau* **35**, 71-74

4.1 Mayer, K. & Pause, G. (1969) Enzymatische Milchsäurebestimmung in Weinen, *Mitt. Geb.Lebensm.Unters.Forsch.* **60**, 230-233

4.2 Postel, W., Drawert, F. & Hagen, W. (1973) Enzymatische Untersuchungen über den Gehalt an L(+) - und D(-)-Lactat in Weinen, *Z.Lebensm. -Unters. u. Forsch.* **150**, 267-273

4.3 Bandion, F. & Valenta, M. (1977) Zur Beurteilung des D(-)- und L(+)-Milchsäuregehalts in Wein, *Mitt. Klosterneuburg* **27**, 4-10

4.4 Drawert, F. & Hagen, W. (1970) Enzymatische Analysemethoden zur Bestimmung von Würze- und Bier-Inhaltsstoffen, I. Bestimmung von L(+)- und D(-)-Milchsäure in Bier, *Brauwissenschaft* **23**, 1-6

4.5 Piendl, A. & Wagner, I. (1983) Physiologische Eigenschaften der organischen Säuren des Bieres; 3. L(+)-Lactat und D(-)-Lactat, *Brauinstitut* **68**, 1520-1528

4.6 Steffen, Chr. (1971) Methoden zur Bestimmung der Gesamtmilchsäure und der Lactatkonfiguration in Käse und Milch, *Schweiz.Milchzeitung* **97**, 1073-1078

4.7 Steffen, Ch., Nick, B. & Blanc, B. H. (1973) Konfiguration der Milchsäure verschiedener Milchsäurebakterienstämme in Abhängigkeit fabrikationstechnischer Bedingungen, *Schweiz. Milchw. Forsch.* **2**, 37-52

4.8 Zaadhof, K.-J., Kohler, J. & Terplan, G. (1975) Erhebungen über den L(+)- und D(-)-Lactat- sowie Pyruvatgehalt in Trockenmilchprodukten, *Deutsche Molkerei-Zeitung* **F9**, 228-233

4.9 Kielwein, G. & Daun, U. (1979) Vorkommen und Bedeutung von D(-)-Milchsäure in fermentierten Milcherzeugnissen unter besonderer Berücksichtigung von Misch-erzeugnissen auf Joghurtbasis, *Deutsche Molkerei-Zeitung* **30**, 290-293

4.10 Jager, H.H. & Tschager, E. (1980) Die enzymatische Bestimmung von L-Milchsäure, D-Milchsäure, Glutaminsäure, Essigsäure und Brenztraubensäure im Käse, *Milchwirtschaftliche Berichte* **64**, 235-240

4.11 Schiweck, H. & Büsching, L. (1972) Die Bildung von D- und L-Milchsäure während des Fabrikationsprozesses, *Zucker* **25**, 7-12

4.12 van der Poel, P. W. (1975) Die mikrobiologische Überwachung des Extraktionssystems durch die Milchsäurebestimmung, *Zucker* **28**, 295-298

4.13 Kubadinow, N. & Rösner, G. (1977) Die enzymatische Bestimmung von D- und L-Milchsäure in Betriebsäften der Zuckerproduktion, *ZUCKER* **30**, 420-426

4.14 Sinell, H.-J. & Luke, K. (1979) D(-)-Lactat als Parameter für die mikrobielle Belastung von vakuumverpacktem Brühwurstaufschnitt, *Fleischwirtschaft* **59**, 547-550

4.15 Schneider, W., Hildebrandt, G. & Sinell, H.-J. (1983) D(-)-Lactat-Konzentration als Parameter für die Bewertung des Frischezustandes vorverpackter, hitzebehandelter Fleischerzeugnisse, *Fleischwirtschaft* **63**, 1198-1205

4.16 Spicher, G. & Rabe, E. (1981) Die Mikroflora des Sauerteigs (XII. Mitteilung), *Z. Lebensmittel Unters. Forsch.* **172**, 20-25

4.17 Klopfer, 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

4.18 Stoya, W., Wachendörfer, G., Kary, I., Siebentritt, P. & Kaiser, E. (1987) Milchsäure als Therapieutikum gegen Varrotose und ihre Auswirkung auf den Honig, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **83**, 283-286

4.19 Liepe, H.-U. (1987) Milchsäure Gemüsesäfte mit Starterkulturen, *Flüssiges Obst* **54**, 380-381

4.20 Littmann-Nienstedt, S. & Beutler, H.-O. (1988) Auswertung des Ringversuches der Arbeitsgruppe "Ei-Analytik" zur Bestimmung von L(-)-Milchsäure, 3-Hydroxybuttersäure und Bernsteinsäure in Eiprodukten, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **84**, 320-322

4.21 Franzke, Cl. & Kroll, J. (1980) Zur enzymatischen Milchsäure-Bestimmung in Emulgatoren, *Die Nahrung* **24**, 89-90

4.22 Schlimme, E., Lorenzen, P. Chr., Martin, D. & Thormählen, K. (1996) Analytical differentiation of buffer types by specific compositional parameters of the aqueous buffer phase, *Milchwissenschaft* **51**, 139-143

5.1 Henniger, G. & Boos, H. (1978) Anwendung der enzymatischen Analyse bei der Untersuchung kosmetischer Präparate - dargestellt an einigen Beispielen, Seifen - Öle - Fette - Wachse **104**, 159-164

D-Milchsäure-Testkontroll-Lösung (Flasche 6)

L-Milchsäure-Testkontroll-Lösung (Flasche 7)

Konzentrationen: siehe Flaschenetiketten

Die D-Milchsäure- und L-Milchsäure-Testkontroll-Lösungen sind stabilisierte wässrige Lösungen von D- bzw. L-Milchsäure. Sie dienen als Testkontroll-Lösungen für die enzymatische Bestimmung von D-Milchsäure und L-Milchsäure in Lebensmitteln und anderen Probematerialien.

Anwendung:

1. Zusatz der Testkontroll-Lösungen zum Testansatz:

Die Testkontroll-Lösungen werden anstelle der Probelösung zur Bestimmung eingesetzt (0,100 ml D-Milchsäure-Testkontroll-Lösung oder 0,100 ml L-Milchsäure-Testkontroll-Lösung).

2. "Quantitativer Nachstart":

Nach Ablauf der Reaktion mit Probelösung und Messung von E_3 werden 0,050 ml der jeweiligen Testkontroll-Lösung zum Probeansatz gegeben. Nach Ablauf der Reaktion (ca. 30 min) wird die Extinktion E_4 gemessen. Aus der Differenz ($E_4 - E_3$) 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 der Angabe des Flaschenetiketts ab.

3. Interner Standard:

Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung (keine groben Fehler bei Testansatz; Probe ist frei von Hemmsubstanzen) können die Testkontroll-Lösungen als interne Standards 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
Suspension 3	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Probelösung	-	0,100 ml	-	0,050 ml
Testkontroll-Lsg.	-	-	0,100 ml	0,050 ml
bidest. Wasser	1,000 ml	0,900 ml	0,900 ml	0,900 ml

mischen, nach ca. 5 min Extinktionen der Lösungen messen (E_1) 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:

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

Ebenfalls verfügbar:

Test-Combination L-Milchsäure, Best. Nr. 10 139 084 035



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



