

L-Äpfelsäure (L-Malat)

UV-Test

zur Bestimmung von L-Äpfelsäure in Lebensmitteln und anderen Probematerialien,

Best. Nr. 10 139 068 035

Test-Combination für 30 Bestimmungen

BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM
Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik

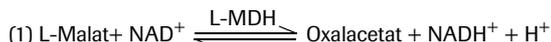
Nur zur Verwendung in der Lebensmittelhygiene.

Lagern bei 2-8°C

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

Prinzip (Lit. 1)

L-Äpfelsäure (L-Malat) wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart von L-Malat-Dehydrogenase (L-MDH) zu Oxalacetat oxidiert (1).



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite von L-Malat. Es wird durch Abfangen des Oxalacetats mit Hilfe der nachgeschalteten Reaktion mit dem Enzym Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) in Gegenwart von L-Glutamat auf die Seite von Oxalacetat und NADH verschoben (2).



Die während der Reaktion gebildete NADH-Menge ist der L-Äpfelsäure-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: Glycylglycin-Puffer, pH ca. 10,0; L-Glutaminsäure, 440 mg
- Flasche 2 mit ca. 210 mg NAD-Lyophilisat
- Flasche 3 mit ca. 0,4 ml Glutamat-Oxalacetat-Transaminase-Suspension, ca. 160 U
- Flasche 4 mit ca. 0,4 ml L-Malat-Dehydrogenase-Lösung, ca. 2400 U
- Flasche 5 mit L-Äpfelsäure-Testkontroll-Lösung zur Testkontrolle (Die Messung der Testkontroll-Lösung ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen.) Testkontroll-Lösung unverdünnt verwenden. (Verwendbar bis: siehe Packungsetikett).

Herstellung der Lösungen

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

Stabilität der Reagenzien

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

Bestimmungsansatz

Wellenlänge¹: 340 nm, Hg 365 nm oder Hg 334 nm
Glasküvette²: 1,00 cm Schichtdicke
Temperatur: 20-25°C
Testvolumen: 2,220 ml
Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette) gegen Wasser oder Leerwert³
Probeflösung: 0,5-35 µg L-Äpfelsäure/Testansatz⁴ (in 0,100-1,000 ml Probevolumen)

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Lösung 1	1,000 ml	1,000 ml
Lösung 2	0,200 ml	0,200 ml
Suspension 3	0,010 ml	0,010 ml
Probeflösung*	-	0,100 ml
bidest. Wasser	1,000 ml	0,900 ml
mischen**, nach ca. 3 min Extinktionen der Lösungen messen (E ₁), s. Hinweise unter Pkt. 10. Reaktion starten durch Zugabe von		
Lösung 4	0,010 ml	0,010 ml
mischen**, nach Ablauf der Reaktion (ca. 5-10 min) Extinktionen von Leerwert und Probe unmittelbar nacheinander messen (E ₂) (s. Pkt. 7).		

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

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

- 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.
- Anstelle von Glasküvetten sind ggf. auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.
- Z. B. bei Verwendung eines Zweistrahlphotometers
- S. Hinweise zur Testdurchführung

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

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

Die gemessenen Extinktionsdifferenzen sollten 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:

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

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 L-Äpfelsäure:

$$c = \frac{2,220 \times 134,09}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E = \frac{2,977}{\epsilon} \times \Delta E \text{ [g L-Äpfelsäure/l Probe-lösung]}$$

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:

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

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Menge an L-Äpfelsäure zwischen 1 µg und 35 µg (Messung bei 365 nm) bzw. 0,5 µg und 20 µg (Messung bei 340, 334 nm) betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probeflösung soweit zu verdünnen, dass die L-Äpfelsäurekonzentration zwischen 0,08 und 0,35 g/l bzw. 0,04 und 0,2 g/l liegt.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge an L-Äpfelsäure im Liter Messung bei		Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor F
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 Probeflösung erneut herzustellen (höhere Einwaage oder weniger starke Verdünnung), oder das in die Küvette zu pipettierende Probevolumen (v) ist bis zu 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

- 2.1 Bei der Berechnung ist eindeutig anzugeben, ob die Ergebnisse als L-Äpfelsäure (Molmasse 134,09 g/Mol) oder als L-Malat (Molmasse 132,07 g/Mol) angegeben werden.
- 2.2 Bei der Beurteilung von Analysenergebnissen ist zu berücksichtigen, dass bei der acidimetrischen Bestimmung der "Gesamtsäure berechnet als L-Äpfelsäure" Protonen gemessen werden und bei der enzymatischen Bestimmung das L-Malat-Ion. Ein Vergleich der Zahlenwerte ist somit nicht möglich.

3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

Die Bestimmung ist spezifisch für L-Äpfelsäure. Das D-Isomer reagiert nicht. Auch L-Milchsäure, D-Milchsäure, L-Asparaginsäure und Fumarsäure werden nicht umgesetzt.

L-Äpfelsäure-ester reagieren nicht (Lit. 3.3).

Bei der Analyse der Reinsubstanz L-Äpfelsäure sind Ergebnisse von ca. 99 % zu erwarten.

4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze (Lit. 1.2)

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 L-Äpfelsäure-Konzentration von 0,25 mg/l Probelösung (bei $v = 0,100$ ml entsprechend 2,5 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von 0,5 mg/l ergibt 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 0,5 µg L-Äpfelsäure/Ansatz (0,5 mg L-Äpfelsäure/l Probelösung; Probevolumen $v = 1,000$ ml) und 35 µg L-Äpfelsäure/Ansatz (0,35 g L-Äpfelsäure/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 L-Äpfelsäure-Konzentration von ca. 2-5 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. 0,02-0,05 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten veröffentlicht:

$$x = 2,97 \text{ g/l Wein} \quad \text{VK} = 1,8 \% \quad n = 12 \quad (\text{Lit. 1.1., 1.2})$$

$$\begin{aligned} \text{Fruchtsaft:} \quad r &= 0,014 + 0,030 \times x & R &= 0,032 + 0,070 \times x \\ x &= \text{Gehalt an L-Äpfelsäure in g/l} & & (\text{Lit. 2.6}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Wein:} \quad r &= 0,03 + 0,034 \times x_i & R &= 0,05 + 0,071 \times x_i \\ x_i &= \text{Gehalt an L-Äpfelsäure in g/l} & & (\text{Lit. 2.10, 2.11}) \end{aligned}$$

7. Störungen

Spuren von Glutamat-Dehydrogenase (GIDH) in GOT führen zu Reagenzien-abhängigen Schleichreaktionen. Eine Extrapolation der Messwerte bei E_2 ist jedoch nicht erforderlich, wenn die Extinktionen von Leerwert und Probe unmittelbar nacheinander abgelesen werden.

8. Erkennen von Störungen

- 8.1 Ist die Umsetzung von L-Äpfelsäure 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-Äpfelsäure (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-Äpfelsäure 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 leicht gefärbte 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 die unverdünnt zum Test eingesetzt werden, 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. 30 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 (L-MDH) eine Schleichreaktion auftritt;

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 Wasser extrahieren bzw. lösen, wenn nötig filtrieren.

11. Anwendungsbeispiele

Bestimmung von L-Äpfelsäure in Wein

Die Bestimmung der freien L-Äpfelsäure in Weiss- oder Rotwein kann direkt oder nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle meist ohne Entfärbung ausgeführt werden.

Bestimmung von freier und veresterter L-Äpfelsäure in Wein (Lit. 3.3)

Zur Ermittlung des Gehalts an Gesamt-L-Äpfelsäure, also der Summe aus freier und veresterter L-Äpfelsäure, wird Weisswein bzw. Rotwein nach folgender Vorschrift behandelt:

20 ml Wein mit 6 ml Natronlauge (2 M) 30 min lang am Rückflusskühler unter Rühren erhitzen (keinen Ammoniak zur alkalischen Hydrolyse verwenden, da eine zu hohe Ammoniumionen-Konzentration den Reaktionsablauf hemmt), auf 20-25°C abkühlen und mit Schwefelsäure (1 M) neutralisieren (Indikatorpapier).

Quantitativ in ein 50 ml-Messkölbchen überführen und mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen. Probe in üblicher Weise zum Test einsetzen (ergibt Gesamtäpfelsäure = Summe von freier und veresterter L-Äpfelsäure).

Bestimmung von L-Äpfelsäure in Fruchtsaft, Konzentraten und Getränken

Klare, flüssige, annähernd neutrale Proben direkt oder nach Verdünnen mit bidest. Wasser (Konzentration an L-Äpfelsäure etwa 0,04-0,35 g/l) zum Test einsetzen.

Trübe Säfte filtrieren und soweit verdünnen, dass die L-Äpfelsäurekonzentration etwa 0,04 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 etwa 0,1 g Polyamidpulver oder Polyvinylpyrrolidon (PVPP) mischen, 1 min rühren und filtrieren. Klare leicht gefärbte Lösung zum Test einsetzen.

Bei Verwendung gefärbter Säfte oder von Rotwein als Probematerial, die unverdünnt zum Test eingesetzt werden, kann es gelegentlich vorkommen, dass durch die Änderung des pH-Wertes (Probe ist sauer, Testmischung hat pH 10) kein Stillstand der Extinktion E_2 auftritt. In diesen Fällen wird empfohlen, die Probe vor der Bestimmung auf pH 10 einzustellen und anschliessend ca. 30 min stehenzulassen.

Bestimmung von L-Äpfelsäure in Bier

Etwa 5-10 ml Bier filtrieren oder zur Entfernung der Kohlensäure etwa 1 min lang mit einem Glasstab rühren. Die weitestgehend CO₂-freie Bierprobe, ggf. nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle, zum Test einsetzen. Alternativ Bierprobe durch Zusatz von Ätzkali (KOH) oder Ätznatron (NaOH) alkalisieren.

Bestimmung von L-Äpfelsäure in festen Lebensmitteln

Halbfeste bzw. feste Proben (z.B. Obst- und Gemüseprodukte) zerkleinern (Mörser, Fleischwolf, Homogenisator). Gut gemischte Probe einwiegen und mit Wasser - falls erforderlich auf 60°C erhitzt - extrahieren. Quantitativ in Messkolben überführen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Filtrieren und klare Lösung zum Test einsetzen. Lösung gegebenenfalls, je nach Gehalt an L-Äpfelsäure verdünnen (s. Verdünnungstabelle).

12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch in der Forschung bei der Analytik von biologischen Proben anwendbar.

Angaben zu Probenahme, Behandlung und Stabilität der Probe s. Gutmann, I. & Wahlefeld, A. W. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1633-1634, Verlag Chemie, Weinheim und Lit. 1.2, Seiten 43-44

Die Methode ist ebenfalls anwendbar bei der Analytik von kosmetischen und pharmazeutischen Erzeugnissen, z. B. Infusionslösungen.

Literatur

- Möllering, H. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1636-1639; Verlag Chemie, Weinheim und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1589-1593, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
- Möllering, H. (1985) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd. ed., vol. VII, pp. 39-47, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- Methoden-Sammlung der Internationalen Fruchtsaft-Union (IFU-Analysen-Methode Nr. 21-1985); 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.)
- Norme Française Homologuée NF V 76-104 (1980) Jus de Fruits et Jus des Légumes: Détermination de la Teneur en Acides Carboxyliques (L-malique, tartrique, citrique, et isocitrique)
- Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 61B (Enzymatische Bestimmungen)/3.4. (1981); Kapitel 28A (Frucht- und Gemüsesäfte u.a.)/7.5 (1988), Kapitel 30A (Wein aus Trauben)/6.4 (1993)
- Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau **77**, 7
- Brautechnische Analysenmethoden, Band III, S. 556-559 (1982), Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK), herausgegeben von F. Drawert im Selbstverlag der MEBAK, Freising
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB; Enzymatische Bestimmung des Gehaltes an L-Äpfelsäure (L-Malat) in Frucht- und Gemüsesäften, 31.00-15 (Januar 1997); Enzymatische Bestimmung des Gehaltes an L-Äpfelsäure (L-Malat) in Gemüsesäften, L 26.26-13 (Januar 1997)

- "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
- Niederlandse Norm NEN 2849 (1e druk, september 1987) Vruchtesappen: Bepaling van het L-appelzuurgehalte; Enzymatische methode (Fruit juices - Determination of the L-malic acid content - Enzymatic method)
 - RSK-Werte, die Gesamtdarstellung, Richtwerte und Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen für Fruchtsäfte und Nektare einschliesslich überarbeiteter Analysemethoden (1987), 1. Auflage, Verlag Flüssiges Obst, D-56370 Eschborn, S. 70-73
 - Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, Complément n° 1 à l'édition officielle de juin 1990, OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, S. 195-197
 - 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 Weinsektor (S. 103-105); Official Journal of the European Communities L 272 (3 October 1990), Commission Regulation (EEC) No 2676/90 of 17 September 1990 determining Community for the analysis of wines (pp. 103-105)
 - AOAC Official Methods of Analysis (1990) 15th Ed., 5th Suppl. (1994), p. 274
 - Deutsche Norm DIN EN 1138 (Dez. 1994) Frucht- und Gemüsesäfte; Enzymatische Bestimmung des Gehaltes an L-Äpfelsäure (L-Malat); Spektrophotometrische Bestimmung von NADH
 - European Standard EN 1138 (Dec. 1994) Fruit and vegetable juices; Enzymatic determination of L-malic acid (L-malate) content by the NADH spectrometric method
 - Standard der Russischen Föderation / Standard of the Russian Federation / GOSSTANDART ROSSII GOST R 51239-98 (1998) Fruit and vegetable juices. Determination of L-malic acid content
 - Mayer, K. & Pause, G. (1969) Äpfelsäure-, Milchsäure- und Zitronensäure-Gehalte in Schweizer Weinen, *Vitis* **8**, 38-49
 - Möhler, K. & Looser, S. (1969) Enzymatische Bestimmung von Säuren in Wein, Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung **140**, 94-100
 - Olschimke, D., Niesner, W. & Junge, Ch. (1969) Bestimmung der Äpfelsäure in Weinen und Traubensäften, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **65**, 383-384
 - Gorin, N. (1976) Differences in L-Malate Determined Enzymatically or Titrimetrically in Golden Delicious Apples, Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung **162**, 259-261
 - Wallrauch, S. (1978) Äpfelsäurebestimmung in Fruchtsäften und Weinen, Die industrielle Obst- und Gemüseverwertung **63**, 488-492
 - Beurteilung des Saftgehaltes niedersafthaltiger Getränke (1979) Der Mineralbrunnen **29**, 126-132
 - Klempf, J., Regula E. & Wassermann, L. (1982) Veränderung der Malat- und Citratgehalte bei der Herstellung von Sauerteigbrot, Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung **175**, 403-405 und (1984) **178**, 187-191
 - Piendl, A. & Wagner, I. (1984) Physiologische Eigenschaften der organischen Säuren des Biers; 4. L-Malat, Brauindustrie **69**, 36-38 und 40
 - 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
 - Elkins, E. R. & Heuser, J. R. (1994) Detection of Adulteration in Apple Juice by L-Malic/Total Malic Acid Ratio: Collaborative Study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.Intern.* **77**, 411-415
 - Saalfeld, U. & Freund, W. (1999) Charakterisierung pulverisierter Sauerteige und Möglichkeiten ihrer qualitativen Bestimmung im Brot - Teil 1: Säuregehalt und Abbaumöglichkeiten für L-Malat und Citrat, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **95**, 209-219

L-Äpfelsäure-Testkontroll-Lösung (Flasche 5)

Konzentration: siehe Flaschenetikett

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

Anwendung:

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

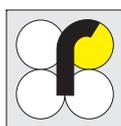
Die Testkontroll-Lösung wird anstelle der Probelösung zur Bestimmung eingesetzt.

2. "Quantitativer Nachstart":

Nach Ablauf der Reaktion mit Probelösung und Messung von E₂ werden 0,050 ml der Testkontroll-Lösung zum Probeansatz gegeben. Nach Ablauf der Reaktion (ca. 10 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 der Angabe des Flaschenetiketts ab.

Ebenso verfügbar:

Test-Combination D-Äpfelsäure, Best. Nr. 11 215 558 035



2.7 Ministero dell' Agricoltura e delle Foreste (1986) Approvazione dei 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

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
Suspension 3	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 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. 3 min Extinktionen der Lösungen messen (E₁). Weiter verfahren wie im Arbeitsschema bei "Bestimmungsansatz" angegeben. Die entsprechenden Fussnoten und "Hinweise zur Testdurchführung" sind zu beachten.

