

Bernsteinsäure (Succinat)

UV-Test

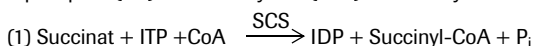
zur Bestimmung von Bernsteinsäure in Lebensmitteln und anderen Probematerialien

Best. Nr. 10 176 281 035

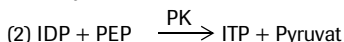
Test-Combination für 11 Bestimmungen

Prinzip (Lit. 1)

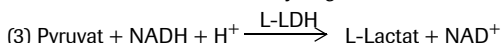
Bernsteinsäure (Succinat) wird in Gegenwart des Enzyms Succinyl-CoA-Synthetase (SCS), auch bekannt als Succinat-Thiokinase, durch Inosin-5'-triphosphat (ITP) und Coenzym A (CoA) zu Succinyl-CoA umgesetzt (1).



Das bei dieser Reaktion entstehende Inosin-5'-diphosphat (IDP) reagiert mit Phosphoenolpyruvat (PEP) bei Anwesenheit von Pyruvat-Kinase (PK) und bildet Pyruvat (2).



Pyruvat wird durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) in Anwesenheit von L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH) reduziert (3).



Die während der Reaktion verbrauchte NADH-Menge ist der Bernsteinsäure-Menge äquivalent. NADH ist Messgrösse und wird aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm bestimmt.

Die Test-Combination enthält

1. Flasche 1 mit ca. 830 mg Lyophilisat, zusammengesetzt aus: Glycylglycin-Puffer, pH ca. 8,4; NADH, ca. 6 mg
2. Flasche 2 mit ca. 11 Tabletten; jede Tablette enthält: CoA, ca. 0,75 mg; ITP, ca. 0,7 mg; PEP-CHA, ca. 0,7 mg
3. Flasche 3 mit ca. 0,5 ml Suspension, zusammengesetzt aus: PK, ca. 250 U; L-LDH, ca. 230 U
4. Flasche 4 mit ca. 0,25 ml Suspension Succinyl-CoA-Synthetase, ca. 12 U

Herstellung der Lösungen

1. Inhalt der Flasche 1 mit 13 ml bidest. Wasser lösen.
2. In einem Becher- oder Reagenzglas je nach Anzahl der Bestimmungen für jeden Ansatz (Leerwert und Proben) **eine** Tablette aus Flasche 2 mit **einem** ml aus Flasche 1 lösen (zur Entnahme der Tabletten aus Flasche 2 beiliegende Pinzette benutzen), ergibt Reaktionsgemisch 2.
3. Inhalt der Flasche 3 unverdünnt verwenden.
4. Inhalt der Flasche 4 unverdünnt verwenden.

Stabilität der Reagenzien

Der Inhalt der Flasche 1 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Die Lösung 1 ist bei 2-8°C 4 Wochen haltbar.

Lösung 1 vor Gebrauch auf 37°C bringen.

Der Inhalt der Flasche 2 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Reaktionsgemisch 2 vor Gebrauch frisch herstellen.

Reaktionsgemisch 2 vor Gebrauch auf 37°C bringen.

Der Inhalt der Flaschen 3 und 4 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Bestimmungsansatz

Wellenlänge¹: 340 nm, Hg 365 nm oder Hg 334 nm

Glasküvette²: 1,00 cm Schichtdicke

Temperatur: 37°C

Testvolumen: 3,070 ml

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

Probeflösung: 1-40 µg Bernsteinsäure/Testansatz³ (in 0,100-2,000 ml Probevolumen)

1 Das Absorptionsmaximum von NADH liegt bei 340 nm. Bei Verwendung von Spektralphotometern wird im Absorptionsmaximum, bei Verwendung von Spektral-Linienphotometern mit Hg-Dampfampe bei einer Messstrahlung von 365 nm oder 334 nm gemessen.
2 Anstelle von Glasküvetten sind auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.
3 S. Hinweise zur Testdurchführung
4 Die Reaktion ist beendet, wenn Probe und Leerwert gleiche Extinktionsänderungen zeigen.

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)

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Reaktionsgemisch 2 (auf 37°C erwärmt)	1,000 ml	1,000 ml
Suspension 3	0,050	0,050 ml
Probeflösung*	-	0,100 ml
bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml
mischen**, ca. 5 min bei 37°C stehen lassen. Extinktionen der Lösungen messen (E ₁). Reaktion starten durch Zugabe von		
Suspension 4	0,020 ml	0,020 ml
mischen**, nach Ablauf der Reaktion (ca. 20 min bei 37°C) Extinktionen von Leerwert und Probe unmittelbar nacheinander messen (E ₂) ⁴ (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)

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

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

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).

Ist die Extinktionsdifferenz der Probe (ΔE_{Probe}) grösser als 0,850 (gemessen bei 340, bzw. Hg 334 nm), bzw. 0,470 (gemessen bei Hg 365 nm), so ist die Konzentration von Bernsteinsäure in der Probeflösung zu hoch. Die Probeflösung ist dann gemäss Verdünnungstabelle zu verdünnen.

Berechnung

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

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

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

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

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient von NADH bei:

$$340 \text{ nm} = 6,3 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Hg } 365 \text{ nm} = 3,4 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Hg } 334 \text{ nm} = 6,18 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

Hieraus ergibt sich für Bernsteinsäure:

$$c = \frac{3,070 \times 118,09}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E = \frac{3,625}{\varepsilon} \times \Delta E \text{ [g Bernsteinsäure/l Probeflösung]}$$

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:

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

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Menge an Bernsteinsäure zwischen 1 µg und 40 µg betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probeflösung soweit zu verdünnen, dass die Bernsteinsäure-Konzentration zwischen 0,05 und 0,4 g/l liegt.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge an Bernsteinsäure im Liter	Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor F
< 0,4 g	-	1
0,4-4,0 g	1 + 9	10
4,0-40 g	1 + 99	100
> 40 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 zu 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 einzusetzen.

2. Technische Hinweise

2.1 Bei der Analytik von Voll-Ei und Voll-Ei-Pulver hat sich die Carrez-Klärung mit "konzentrierten Carrez-Lösungen" bewährt (s. Lit. 2.1.) Die Probelösung kann auch zur Bestimmung von D-3-Hydroxybuttersäure und L-Milchsäure verwendet werden.

2.2 Bei der Berechnung ist eindeutig anzugeben, ob die Ergebnisse als Bernsteinsäure (Molmasse 118,09 g/Mol) oder als Succinat (Molmasse 116,07 g/Mol) angegeben werden. (Bei der enzymatischen Bestimmung wird das Succinat-Ion gemessen.)

3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

Succinyl-CoA-Synthetase reagiert neben Bernsteinsäure auch mit Itaconsäure, deren Vorkommen in Lebensmitteln jedoch im Vergleich zur Bernsteinsäure sehr gering ist. Sie kann deshalb bei der Bestimmung vernachlässigt werden.

Bei der Analyse der Reinsubstanz Bernsteinsäure sind Ergebnisse von ca. 100% 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 $v = 2,000$ ml und Messung bei 340 nm einer Bernsteinsäure-Konzentration von 0,15 mg/l Probelösung (bei $v = 0,100$ ml entsprechend 3 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von 0,6 mg/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,020 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probevolumen $v = 2,000$ ml.

5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von ca. 1 μ g Bernsteinsäure/Ansatz (0,6 mg Bernsteinsäure/l Probelösung; Probevolumen $v = 2,000$ ml) bis 40 μ g Bernsteinsäure/Ansatz (0,4 g Bernsteinsäure/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 Bernsteinsäure-Konzentration von ca. 3-6 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. 0,03-0,06 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten veröffentlicht:

VK = 0,98-1,4 % $n = 15$ in der Serie (Lit. 1.2)

Trockenvollei-Pulver:

$x = 11$ mg/kg

$r = 6,8$ mg/kg

$R = 12,1$ mg/kg

$s_{(r)} = \pm 2,4$ mg/kg

$s_{(R)} = \pm 4,3$ mg/kg

(Lit. 2.1)

7. Störungen

Fumarsäure reagiert mit SCS, allerdings unter den angegebenen Reaktionsbedingungen sehr langsam, mit einer "Schleichreaktion". Sie kann in bekannter Weise durch rechnerische Extrapolation der gemessenen Extinktionen auf den Zeitpunkt der Zugabe von Suspension 4 (SCS) berücksichtigt werden.

Sowohl "NADH-Oxidasen" im Testsystem, als auch die Neigung von Succinyl-CoA zur Hydrolyse, insbesondere unter alkalischen Bedingungen, führen zu Schleichreaktionen. Eine Schleichextrapolation ist allerdings nicht erforderlich, wenn die Extinktionen von Leerwert und Probe unmittelbar nacheinander gemessen werden.

8. Erkennen von Störungen

8.1 Ist die Umsetzung von Bernsteinsäure 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 Bernsteinsäure (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 Extinktionsdifferenzen 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 Bernsteinsäure 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 2,000 ml zum Test einsetzen;

trübe Lösungen filtrieren;

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

saure Proben mit Kalilauge oder Natronlauge auf ca. 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 Probevolumen zum Test eingesetzt werden, mit Polyvinylpyrrolidon, PVPP (1 g/100 ml) behandeln;

feste und halb feste 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 enteissen oder mit Carrez-Reagenzien (s.u.) klären;

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 einen 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 = 720 g $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$ ml) sorgfältig dosieren. Mit Natronlauge (0,1 M; z.B. 10 ml) pH 7,5-8,5 einstellen. Nach jeder Zugabe mischen, Messkolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren.

Zur Vorbereitung der Probe von Ei und Ei-Produkten s. Pkt. 11 (Anwendungsbeispiele). Hinweis: In der Routine-Analytik hat sich die Carrez-Klärung (mit "konzentrierten Carrez-Lösungen") bewährt. Das Verfahren wurde im Rahmen der Standardisierung von Methoden in Deutschland nach § 64. Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG) veröffentlicht. Die aus der Carrez-Klärung erhaltene Probelösung kann auch zur Bestimmung von D-3-Hydroxybuttersäure und L-Milchsäure verwendet werden.

11. Anwendungsbeispiele

Bestimmung von Bernsteinsäure in Wein

Die Bestimmung der Bernsteinsäure in Weiss- oder Rotwein kann meist ohne Verdünnung oder Entfärbung ausgeführt werden. Zum Test 0,100 ml Probe einsetzen.

Bestimmung von Bernsteinsäure in Sojasosse

1 ml Sojasosse mit 2 ml verdünnter Carrez-I-Lösung (3,60 g Kalium-hexacyanoferrat(II), $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$ ml) versetzen und leicht schwenken. Dann 2 ml verdünnte Carrez-II-Lösung (7,20 g Zinksulfat, $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$ ml) hinzufügen und leicht schwenken. Mischung filtrieren (nicht neutralisieren, da sonst die Lösung wieder schwarz wird!). Filtrat mit $v = 0,100$ ml zum Test einsetzen. Verdünnungsfaktor $F = 5$ bei der Berechnung berücksichtigen.

Bestimmung von Bernsteinsäure in Fruchtsäften

Farblose Fruchtsäfte können direkt zum Test eingesetzt werden. Wegen des geringen Bernsteinsäuregehaltes ist das Probevolumen aber meist grösser als 0,100 ml. Saure Säfte müssen neutralisiert werden (Verdünnung durch Zugabe von Lauge muss dabei berücksichtigt werden). Gefärbte Säfte müssen mit PVPP behandelt werden.

Bestimmung von Bernsteinsäure in Protein-haltigen Proben

Protein-haltige Probelösungen mit Perchlorsäure (1 M) im Verhältnis 1+2 bis 1 + 3 mischen, zentrifugieren, einen aliquoten Teil der überstehenden Lösung mit Kalilauge (2 M) neutralisieren, im Messkolben auf das angegebene Volumen auffüllen, zur Ausfällung des Kaliumperchlorates 20 min in den Kühlschrank stellen, filtrieren. Klare, verdünnte Lösung zum Test einsetzen.

Bestimmung von Bernsteinsäure in Emmentaler Käse

Ca. 5 g geraspelten Käse in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, ca.80 ml bidest. Wasser hinzufügen, 15 min bei 60°C halten (gelegentlich leicht schwenken!), auf 20-25°C abkühlen lassen, bis zur Marke mit Wasser auffüllen, im Kühlschrank zur Fettabcheidung ca. 20 min stehen lassen, zentrifugieren; 0,100 bis 0,200 ml zum Test einsetzen.

Bestimmung von Bernsteinsäure in Flüssig-Vollei (Lit. 2.1)

Ca. 5 g homogenisiertes Vollei in einen 25 ml-Messkolben genau einwiegen, 10 ml bidest. Wasser und 1 Tropfen n-Octanol hinzufügen, mischen und 15 min im Wasserbad (ca. 100°C) erhitzen. Kolben auf 20-25°C abkühlen, der Reihe nach zugeben und nach jeder Zugabe kräftig schwenken: 1 ml konzentrierte Carrez-I-Lösung (15,0 g Kalium-hexacyanoferrat(II), $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$ ml), 1 ml konzentrierte Carrez-II-Lösung (30,0 g Zinksulfat, $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$ ml). Mit NaOH (0,1 M) bis zur Marke auffüllen, mischen und mit Faltenfilter und Glasrichter filtrieren. Filtrat zum Test einsetzen ($v = 0,100$ ml bei mikrobiell kontaminiertem Ei und $v = 1,000$ ml bei Frischei). Geändertes Probevolumen bei der Berechnung berücksichtigen.

Bestimmung von Bernsteinsäure in Vollei-Pulver (Lit. 2.1)

Ca. 1 g Vollei-Pulver in einen 25 ml-Messkolben genau einwiegen, 12 ml bidest. Wasser und 1 Tropfen n-Octanol hinzufügen, mischen und 15 min im Wasserbad (ca. 100°C) erhitzen. Kolben auf 20-25°C abkühlen, der Reihe nach zugeben und nach jeder Zugabe kräftig schwenken: 1 ml konzentrierte

Carrez-I-Lösung (15,0 g Kalium-hexacyanoferrat(II), $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$ ml), 1 ml konzentrierte Carrez-II-Lösung (30,0 g Zinksulfat, $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$ ml). Mit NaOH (1 M) pH auf ca. 8-9 einstellen, Messkolben mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und mit Faltenfilter und Glasrichter filtrieren. 0,100-1,000 ml Filtrat zum Test einsetzen. Geändertes Probevolumen bei der Berechnung berücksichtigen.

Bestimmung von Bernsteinsäure in Sojamehl-haltigen Pasten

Ca. 5 g pastöses Material in einen 50 ml-Messkolben auf 1 mg genau einwiegen und mit ca. 40 ml bidest. Wasser versetzen. 10 min im Wasserbad (ca. 70°C) erhitzen. Kolben auf 20-25°C abkühlen und mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen. Mischen und filtrieren. Die ersten ml des Filtrats verwerfen. 0,100 ml des Filtrats zum Test einsetzen.

12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch in der Forschung bei der Analytik von biologischen Proben anwendbar. Zu Probenahme, Behandlung und Stabilität der Probe s. Lit. 1.2.

Literatur

- 1.1 Michal, G., Beutler, H.-O., Lang, G. & Güntner, U. (1976) Enzymatic determination of succinic acid in foodstuffs, Z. Anal. Chem. **279**, 137-138
- 1.2 Beutler, H.-O. (1985) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VII, pp. 25-33, Verlag Chemie Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- 2.1 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von L-Milchsäure, Bernsteinsäure und D-3-Hydroxybuttersäure in Ei und Eiprodukten, 05.00-2 (November 1987)
- 2.2 European Communities: 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
- 2.3 Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 30A (Wein aus Trauben)/6.8 (1994)
- 3.1 Sponholz, W.R. & Dittrich, H.H. (1977) Enzymatische Bestimmung von Bernsteinsäure in Mosten und Weinen, Weinwissenschaft **32**, 38-47
- 3.2 Wagner, K. & Kreuzer, P. (1977) Zusammensetzung und Beurteilung von Auslesen, Beeren- und Trockenbeerenauslesen, Die Weinwirtschaft **10**, 272-275
- 3.3 Joyeux, A. & Lafon-Lafourcade, S. (1979) Dosage de l'acide succinique dans les vins par methode enzymatique, Ann. Fals. Exp. Chim **72**, 317-320
- 3.4 Beutler, H.-O., Schneider, H., Schütz, A. & Henniger, G. (1986) Succinic Acid - A New Test Kit for Enzymatic Determination, Poster-Präsentation bei Association of Official Analytical Chemists Annual International Meeting, Scottsdale, AZ, USA
- 3.5 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

Bernsteinsäure-Testkontroll-Lösung

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

Reagenzien

Bernsteinsäure, p.A.

Herstellung der Testkontroll-Lösung

40 mg Bernsteinsäure auf 0,1 mg genau einwiegen und im Messkolben mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen und gründlich mischen. Lösung vor Gebrauch frisch herstellen. Ggf. kann die Lösung portionsweise eingefroren werden.

Anwendung:

1. Zusatz der Bernsteinsäure-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. 30 min bei 37°C) wird die Extinktion E_3 gemessen. Aus der Differenz ($E_2 - E_3$) 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 dem Ergebnis ab, das gem. Pkt. 1 ermittelt wurde.

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
Reaktionsgemisch 2	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Suspension 3	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
Probelösung	-	0,100 ml	-	0,050 ml
Testkontroll-Lsg.	-	-	0,100 ml	0,050 ml
bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	1,900 ml

mischen, ca. 5 min bei 37°C stehen lassen und 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:

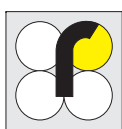
$$\text{Wiederfindung} = \frac{2 \times \Delta E_{\text{Probe}} + \text{Standard} - \Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}} \times 100 [\%]$$

4. Wiederfindungsversuch mit Originalproben:

Zur Absicherung der Messung einschliesslich Vorbereitung der Probe können Wiederfindungsversuche durchgeführt werden. Hierfür wird entweder die oben genannte Testkontroll-Lösung verwendet oder aber eine Testkontroll-Lösung mit einer geeigneten Konzentration.

Die Originalprobe wird mit und ohne Zusatz von Bernsteinsäure gemessen, wobei der Zusatz an Bernsteinsäure entsprechen soll

- der in der Originalprobe erwarteten Bernsteinsäure-Menge, oder
- der Menge, die z.B. gemäss Standards oder sonstiger Regelungen in der Originalprobe enthalten sein darf.



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

