

UV-Test für ca. 32 Bestimmungen

Nur für den Laborgebrauch
Lagern bei +2 bis +8 °C

Die Methode ist enthalten im deutschen, italienischen, schweizerischen Lebensmittelrecht und in Europäischen Verordnungen. Empfohlen z.B. vom IFU (International Federation of Fruit Juice Producers), AIJN (Association of the Industry of Juices and Nectars), MEBAK (Mitteleuropäische Brautechnische Analysen-Kommission), OIV (Office International de la Vigne et du Vin). Standardisiert von DIN (Deutschland), EN (Europa), GOST (Russland), NEN (Holland), NF (Frankreich). Anerkannt durch die AOAC (Association of Analytical Communities, USA).

Prinzip



Ref.: 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.

Durchführung der Bestimmung

Wellenlänge: 340 nm (NADH), $\epsilon = 6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
 Schichtdicke: 1,00 cm (Glas- oder Plastikkuvette)
 Temperatur: +20 bis +25 °C
 Testvolumen: 2,220 ml
 Messung: gegen Luft oder Wasser
 Probelösung: 0,5 bis 30 µg L-Äpfelsäure in 0,100 bis 1,000 ml Probelösung

Reagenzien

- # 1: Ca. 34 ml Glycylglycin-Puffer, pH ca. 10,0, ca. 490 mg L-Glutaminsäure (Stabilität s. Packungsetikett). *Die Lösung ist gebrauchsfertig.*
- # 2: NAD, Lyophilisat, ca. 250 mg (Stabilität s. Packungsetikett). *Inhalt der Flasche # 2 mit 7 ml bidest. Wasser lösen. Die Lösung ist 1 Monat bei +2 bis +8 °C, bzw. 2 Monate bei -15 bis -25 °C stabil.*
- # 3: Ca. 0,4 ml Suspension Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) (ca. 160 U) in Ammoniumsulfat (Stabilität s. Packungsetikett). *Die Suspension ist gebrauchsfertig. Flasche vorsichtig schwenken bevor die Suspension pipettiert wird.*
- # 4: Ca. 0,4 ml Lösung L-Malat-Dehydrogenase (L-MDH) (ca. 2400 U) in Glycerin (Stabilität s. Packungsetikett). *Die Lösung ist gebrauchsfertig.*

Zusätzlich wird benötigt (nicht im Kit enthalten):

Standard-Lösung L-Äpfelsäure, 0,15 g/l zur Testkontrolle.

Die Reagenzien zur Bestimmung von L-Äpfelsäure sind nicht gefährlich. Die allgemeinen Regeln beim Arbeiten in chemischen Laboratorien sollten jedoch eingehalten werden. Nach Gebrauch können die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgt werden. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

Bestimmungsansatz

In Küvetten pipettieren:	Leerwert	Standard ¹	Probe ²	Ansatz Duplikat Probe ³	Ansatz mit internem Standard ⁴	Ansatz für Spuren-Analytik ⁵
Glycylglycin-Puffer # 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
NAD-Lösung # 2	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml
GOT-Suspension # 3	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml
Probelösung⁶ (z. B. 0,02 bis 0,15 g L-Äpfelsäure/l)	-	-	0,100 ml	0,200 ml	0,100 ml	1,000 ml
Standardlösung ⁶ (z. B. 0,15 g L-Äpfelsäure/l)	-	0,100 ml	-	-	0,100 ml	-
Bidest. Wasser	1,000 ml	0,900 ml	0,900 ml	0,800 ml	0,800 ml	-
Mischen⁷, nach ca. 3 min Extinktionen (E₁) messen. Zugeben:						
L-MDH-Lösung # 4	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml
Mischen⁷, nach Ablauf der Reaktion (ca. 5 bis 10 min) Extinktionen von Leerwert und den anderen Ansätzen (E₂) unmittelbar nacheinander messen. Extinktionsmessungen nach weiteren 2 min wiederholen⁸.						

Hinweise

- Das Mitführen eines "Standards" dient ausschließlich zur Erkennung von Unregelmäßigkeiten in der Analyse. Die Messung des Standards wird nicht benötigt zur Berechnung von Ergebnissen.
- Dieser Ansatz zusammen mit dem Leerwert ist eine "Einzelbestimmung".
- Im Fall einer "Doppelbestimmung" werden 2 Ansätze mit verschiedenen Probevolumina ausgeführt. Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein. Ergebnisse mit den entsprechenden Probevolumina v berechnen.
- Wiederfindung = $[(\Delta E_{\text{Probe+Standard}} - \Delta E_{\text{Probe}}) / \Delta E_{\text{Standard}}] \times 100 [\%]$
- In der Spurenanalytik wird empfohlen, das Probevolumen bis zu 1,000 ml (0,0005 bis 0,015 g L-Äpfelsäure/l) zu erhöhen.
- Vor der Dosierung Enzympipetten, bzw. Spitzen der Kolbenhubpipetten mit Probe- bzw. Standardlösung mehrfach vorspülen.
- z. B. mit einem Plastikspatel, oder durch Umschwenken nach Verschließen der Küvette mit Parafilm® (American Can Co., Greenwich Ct., USA).
- Die Reaktion ist beendet, wenn die gemessene Extinktion (Probe gegen Leerwert) konstant ist. Ist dies nicht der Fall, die Ansätze, die die Probelösung enthalten, weiter in Abständen von 2 min messen, bis die Extinktionszunahme konstant ist. Extinktionen auf die Zeit der Zugabe von L-MDH (Lösung # 4) extrapolieren.
- Ergebnisse aus der acidimetrischen Bestimmung der 'Gesamtsäure' berechnet als Äpfelsäure (es werden Protonen gemessen) können nicht mit Ergebnissen aus der enzymatischen Analyse verglichen werden

Vorbereitung der Proben

1. *Klare, farblose, annähernd neutrale flüssige Proben* ggf. verdünnen, um eine Probelösung mit 0,02 bis 0,15 g L-Äpfelsäure/l zu erhalten.
2. *Trübe Lösungen* filtrieren oder zentrifugieren, ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
3. *Kohlensäure-haltige Proben*, z. B. durch Filtration entgasen, oder NaHCO₃ zugeben, bis die Lösung schwach alkalisch ist. Ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
4. *Saure (insbesondere leicht gefärbte) Lösungen* mit KOH oder NaOH auf pH 8 bis 10 einstellen, einige Minuten inkubieren, oder im Fall von farblosen Proben ohne pH-Einstellung verdünnen (s. Pkt. 1).
5. *„Gefärbte Proben“* (auf pH 8 eingestellt) gegen Probe-Leerwert messen.
6. *„Stark gefärbte Lösungen“*, die unverdünnt gemessen werden, mit PVPP, z.B. 1 g/100 ml, behandeln, mischen, einige Minuten inkubieren, filtrieren.
7. *Feste Proben* zerkleinern (Korngröße < 0,3 mm), bzw. *halbfeste (pastöse) Proben* homogenisieren, mit Wasser extrahieren, oder in Wasser lösen, filtrieren und ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
8. *Fetthaltige Proben* mit heißem Wasser (Temperatur über dem Schmelzpunkt des Fettes), z. B. in einem 100 ml-Messkolben extrahieren. Auf +20 °C bringen, Messkolben bis zur Marke füllen. 15 min in Eis, bzw. 30 min in Kühlschrank stellen, filtrieren.
9. Carrez Klärung und Deproteinierung mit Perchlorsäure können nicht durchgeführt werden (zu niedrige Wiederfindung).

Berechnung⁹

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

$$c = (V \times MW \times \Delta E) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \quad [\text{g L-Äpfelsäure/l Probelösung}]$$

$$c = (2,220 \times 134,09 \times \Delta E) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,4725 \times \Delta E} \quad [\text{g/l L-Äpfelsäure}]$$

Wurde bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen, muss das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert werden.

Bei der Analyse von Proben, die für die Analyse eingewägt werden, wird das Ergebnis auf die Einwaage bezogen:

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

Eigenschaften des Tests

1. *Spezifisch* für L-Äpfelsäure (das L-Malat-Ion reagiert). Bei der Analyse von handelsüblicher L-Äpfelsäure sind Ergebnisse von ca. 99 % zu erwarten.
2. *Empfindlichkeit:* 0,25 mg/l ($\Delta E = 0,005$; $v = 1,000$ ml; $V = 2,220$ ml)
3. *Nachweisgrenze:* 0,5 mg/l ($\Delta E = 0,010$; $v = 1,000$ ml; $V = 2,220$ ml)
4. *Linearität:* von 0,5 µg/Ansatz ($v = 1,000$ ml; $V = 2,220$ ml)
bis 30 µg/Ansatz ($v = 0,100$ ml; $V = 2,220$ ml)
5. *Präzision:* $\Delta E = \pm 0,005$ bis $0,010$ Extinktionseinheiten
VK = ca. 1 bis 2 %

Fruchtsaft: $r = 0,014 + 0,030 \times c_{\text{L-Äpfelsäure in g/l}} [\text{g/l}]$
 $R = 0,032 + 0,070 \times c_{\text{L-Äpfelsäure in g/l}} [\text{g/l}]$

Wein: $r = 0,03 + 0,034 \times c_{\text{L-Äpfelsäure in g/l}} [\text{g/l}]$
 $R = 0,05 + 0,071 \times c_{\text{L-Äpfelsäure in g/l}} [\text{g/l}]$
6. *Störungen:* Nach der Umsetzung von L-Äpfelsäure kann bei E₂ eine reagenzienabhängige Schleichreaktion auftreten. Eine Extrapolation der Extinktionswerte auf den Zeitpunkt der Zugabe von L-MDH ist jedoch nicht erforderlich, wenn die Extinktionen von Leerwert und Proben unmittelbar nacheinander gemessen werden.