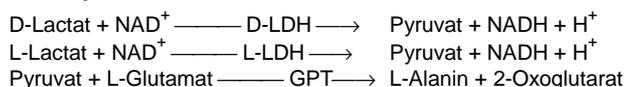


UV-Methode für ca. 32 Ansätze

 Nur für den Laborgebrauch
Lagern zwischen +2 und +8°C

Die Methoden (D- und/oder L-Milchsäure) sind enthalten im deutschen, holländischen, italienischen und schweizerischen Lebensmittelrecht, sowie in europäischen Verordnungen. Empfohlen z. B. von IDF, IFU, AIJN, MEBAK, OIV, VDLUFA. Standardisiert von DIN, EN, ISO, GOST.

Prinzip


 Ref.: Gawehn, K. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 3rd. ed., vol. VI, pp. 588-592, Verlag Chemie, Weinheim, Basel.
Noll, F. (1966) Methode zur quantitativen Bestimmung von L(+)-Lactat mittels LDH und GPT, Biochem. Z. 346, 41-49.

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 Plastikküvette)
 Temperatur: +20 bis +25°C
 Testvolumina (wenn die D-Lactat-Konzentration geringer ist als die L-Lactat-Konzentration):
 2,240 ml (D-Milchsäure)
 2,260 ml (L-Milchsäure)
 Messung: gegen Luft oder Wasser
 Probelösung: 0,3 bis 30 µg D- + L-Milchsäure 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. 0,7 ml Suspension Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) (ca. 1100 U) in Ammoniumsulfat (Stabilität siehe Packungsetikett). Die Suspension ist gebrauchsfertig. Flasche vorsichtig schwenken bevor die Suspension pipettiert wird.
 #4-D: Ca. 0,7 ml Lösung D-Lactat-Dehydrogenase (D-LDH) (ca. 3800 U) in Glycerin (Stabilität siehe Packungsetikett). *Die Lösung ist gebrauchsfertig.*
 #4-L: Ca. 0,7 ml Lösung L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH) (ca. 3800 U) in Glycerin (Stabilität siehe Packungsetikett). *Die Lösung ist gebrauchsfertig.*

Zusätzlich wird benötigt (nicht im Kit enthalten):

Standardlösung D- bzw. L-Lactat, Lithium- oder Calcium-Salz, 0,15 g D- bzw. L-Milchsäure/l zur Testkontrolle.

Die Reagenzien zur Bestimmung von D- und L-Milchsäure 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 Spurenanalytik 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
GPT-Suspension # 3	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Probelösung⁶ (z. B. 0,02 bis 0,15 g D- + L-Milchsäure/l)	-	-	0,100 ml	0,200 ml	0,100 ml	1,000 ml
Standardlösung ⁶ (z. B. 0,15 g D- bzw. L-Milchsäure/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. 5 min Extinktionen (E₁) messen. Zugeben:						
D-LDH-Lösung # 4-D	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Mischen⁷, nach Ablauf der Reaktion (ca. 30 min) Extinktionen von Leerwert und anderen Ansätzen (E₂) unmittelbar nacheinander messen. Zugeben:						
L-LDH-Lösung # 4-L	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Mischen⁷, nach Ablauf der Reaktion (ca. 30 min) Extinktionen von Leerwert und den anderen Ansätzen (E₃) unmittelbar nacheinander messen. Extinktionsmessungen nach weiteren 2 min wiederholen⁸.						

Siehe Hinweise auf der nächsten Seite

Berechnung⁹:

$$\Delta E_{D\text{-Milchsäure}} = (E_2 - E_1)_{\text{Probe bzw. Standard}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

$$\Delta E_{L\text{-Milchsäure}} = (E_3 - E_2)_{\text{Probe bzw. Standard}} - (E_3 - E_2)_{\text{Leerwert}}$$

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

$$c = (2,240 \times 90,1 \times \Delta E) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,3204 \times \Delta E \text{ [g D-Milchsäure/l Probelösung]}}$$

$$c = (2,260 \times 90,1 \times \Delta E) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,3232 \times \Delta E \text{ [g L-Milchsäure/l Probelösung]}}$$

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 eingewogen werden, wird das Ergebnis auf die Einwaage bezogen:

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

Vorbereitung der Proben:

Wird die Testdurchführung durch eine der untenstehenden Probeeigenschaften beeinflusst, muss die entsprechende Probenvorbereitung durchgeführt werden:

1. *Klare, farblose, annähernd neutrale flüssige Proben* ggf. verdünnen, um 0,02 bis 0,15 g D- + L-Milchsäure/l zu erhalten.
2. *Trübe Lösungen* filtrieren oder zentrifugieren, ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
3. *Kohlensäurehaltige Proben* z.B. durch Filtration entgasen, oder NaHCO₃ zugeben bis die Lösung schwach alkalisch ist.
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 oder Polyamid, 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. Alternativ mit Carrez Reagenzien klären (wird empfohlen).
9. *Proteinhaltige Proben* mit Carrez-Reagenzien klären: Ausreichende Menge der festen oder pastösen Probe in einen 100 ml-Messkolben einwiegen, ca. 60 ml Wasser zugeben. Oder flüssige Probe in einen 100 ml-Messkolben, der ca. 60 ml Wasser enthält, pipettieren. Nacheinander zugeben und nach jeder Zugabe mischen: 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g K₄[Fe(CN)₆] x 3H₂O = Kalium-hexacyanoferrat(II)/100 ml), 5 ml Carrez-II-Lösung (7,20 g ZnSO₄ x 7 H₂O = Zink-sulfat-hepta-hydrat/100 ml). Durch Zugabe von z. B. 10 ml NaOH (0,1 M) pH auf 7,5 bis 8,5 einstellen. Messkolben bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren.
10. *Proteinhaltige Proben* mit Perchlorsäure deproteinieren.

Eigenschaften des Tests

1. **Spezifität:** Spezifisch für D-Milchsäure (das D-Lactat-Ion reagiert), bzw. für L-Milchsäure (das L-Lactat-Ion reagiert). Bei der Analyse von handelsüblichem D-Lactat (L-Lactat) sind Ergebnisse von ca. 99 (98) % zu erwarten. Freie Milchsäure kann nicht als Standardmaterial verwendet werden, da partiell gebildetes Lactyl-lactat nicht reagiert.
2. **Empfindlichkeit:** 0,15 mg/l (ΔE = 0,005; v = 1,000 ml; V = 2,240 / 2,260 ml)
3. **Nachweisgrenze:** 0,3 mg/l (ΔE = 0,010; v = 1,000 ml; V = 2,240 / 2,260 ml)
4. **Linearität:** 0,3 µg/Ansatz (v = 1,000 ml; V = 2,240 / 2,260 ml)
bis 30 µg/Ansatz (v = 0,100 ml; V = 2,240 / 2,260 ml)
5. **Präzision:** ΔE = +/- 0,005 bis 0,010 Extinktionseinheiten
VK = ca. 2 bis 3 %

Joghurt:	r	= 0,03 g D-Milchsäure/100 g	r = 0,05 g L-Milchsäure/100 g
	R	= 0,05 g D-Milchsäure/100 g	R = 0,07 g L-Milchsäure/100 g
Wein:	r	= 0,02 + 0,07 x CL-Milchsäure in g/l [g/l]	
	R	= 0,05 + 0,125 x CL-Milchsäure in g/l [g/l]	
6. **Störungen:** Nach der Umsetzung von Milchsäure kann eine reagenzienabhängige Schleichreaktion auftreten. Eine Extrapolation der Extinktionswerte auf den Zeitpunkt der Zugabe von D- bzw. L-LDH (Lösung # 4-D, bzw. # 4-L) ist jedoch nicht erforderlich, wenn die Extinktionen von Leerwert und Proben unmittelbar nacheinander gemessen werden.
7. **Technische Hinweise:** Handschweiß enthält L-Lactat.

Hinweise:

1. Das Mitführen eines "Standards" dient ausschließlich zur Erkennung von Unregelmäßigkeiten in der Analyse. Die Messung des Standards wird nicht benötigt zur Berechnung von Ergebnissen.
2. Dieser Ansatz, zusammen mit dem Leerwert, ist eine "Einzelbestimmung".
3. 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.
4. Wiederfindung = [(ΔE_{Probe+Standard} - ΔE_{Probe}) / ΔE_{Standard}] x 100 [%]
5. In der Spurenanalytik wird empfohlen, das Probevolumen bis zu 1,000 ml (0,0003 bis 0,015 g D- + L-Milchsäure/l) zu erhöhen.
6. Vor der Dosierung Enzympipetten, bzw. Spitzen der Kolbenhubpipetten mit Probe- bzw. Standardlösung mehrfach vorspülen.
7. z. B. mit einem Plastikspatel, oder durch Umschwenken nach Verschließen der Küvette mit Parafilm® (American Can Co., USA).
8. Die Reaktion ist beendet wenn die gemessene Extinktion konstant ist. Ist dies nicht der Fall, weiter in Abständen von 2 Min. messen, bis die Extinktionszunahme konstant ist. Extinktionen auf die Zeit der Zugabe von D-LDH (Lösung # 4D) bzw. L-LDH (Lösung # 4L) extrapolieren.
9. Ergebnisse aus der acidimetrischen Bestimmung der 'Gesamtsäure' berechnet als Milchsäure (es werden Protonen gemessen) können nicht mit Ergebnissen aus der enzymatischen Analyse verglichen werden.