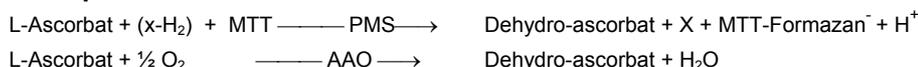


UV-Methode für ca. 24 Ansätze

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

Die Methode ist empfohlen z. B. von MEBAK (Central European Commission for Brewing Technology).

### Prinzip



Ref.: Beutler, H.-O. & Beinstingl, G. (1980) Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Lebensmitteln, Deutsche Lebensmittel-Rundschau 76, 69-75.

### Durchführung der Bestimmung

Wellenlänge: 578 nm (MTT-formazan)  
 $\epsilon = 16,9 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$   
 Schichtdicke: 1,00 cm (Glas- oder Plastikküvette)  
 Temperatur: +37°C  
 Testvolumen: 2,700 ml  
 Messung: gegen Luft, gegen Wasser, oder gegen Probe-Leerwert  
 Probelösung: 0,5 bis 20 µg L-Ascorbinsäure in 0,100 bis 1,600 ml Probelösung

### Reagenzien

- # 1: 2 Flaschen, jeweils mit ca. 26 ml Na-phosphat-/ Citrat-Puffer, pH ca. 3,5, ca. 80 mg 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid, MTT (Stabilität siehe Packungsetikett). *Die Lösung ist gebrauchsfertig.* Lösung # 1 vor Gebrauch auf +37°C bringen. Um die Stabilität der Lösung # 1 (MTT-Puffer) zu garantieren, nur die Menge für den unmittelbaren Gebrauch aus Flasche # 1 entnehmen und auf +37°C bringen.
- # 2: Lyophilisat mit ca. 600 U Ascorbat-Oxidase (AAO) (Stabilität s. Packungsetikett). *Inhalt der Flasche # 2 mit 0,5 ml bidest. Wasser lösen.* Die Lösung ist 6 Wochen bei +2 bis +8 °C stabil.
- # 3: Flasche mit ca. 5,5 ml PMS-Lösung, ca. 25,3 mg 5-Methylphenazinium-methylsulfat (Stabilität siehe Packungsetikett). *Die Lösung ist gebrauchsfertig.*

Zusätzlich wird benötigt (nicht im Kit enthalten):

Standardlösung L-Ascorbinsäure, ultrapur, 0,2 g/l zur Testkontrolle.

Die Reagenzien zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure 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:	Standard-Leerwert <sup>1</sup>	Standard-ansatz <sup>1</sup>	Probe-Leerwert <sup>2,3,4</sup>	Probe-Ansatz <sup>2,3,4</sup>	Interner Standard-Leerwert <sup>5</sup>	Standard- und Probeansatz <sup>5</sup>
Na-phosphat, Citrat, MTT-Lösung # 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Bidest. Wasser	1,480 ml	1,500 ml	1,480 ml	1,500 ml	1,480 ml	1,500 ml
<b>Probelösung<sup>6</sup></b> (z. B. 0,02 bis 0,2 g L-Ascorbinsäure/l)	-	-	<b>0,100 ml</b>	<b>0,100 ml</b>	<b>0,050 ml</b>	<b>0,050 ml</b>
Standardlösung <sup>6</sup> (z. B. 0,2 g L-Ascorbinsäure/l)	0,100 ml	0,100 ml	-	-	0,050 ml	0,050 ml
AAO-Lösung # 2	0,020 ml	-	0,020 ml	-	0,020 ml	-
<b>Kräftig mischen<sup>7</sup> (es wird Luft eingemischt), 6 min bei +37°C inkubieren. Extinktionen (E<sub>1</sub>) messen. Zugeben:</b>						
PMS-Lösung # 3	0,100 ml	0,100 ml	0,100 ml	0,100 ml	0,100 ml	0,100 ml
<b>Mischen<sup>7</sup>, 15 min bei +37°C inkubieren (im Dunkeln, da das System lichtempfindlich ist !!). Extinktionen (E<sub>2</sub>) messen.</b>						

### 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 In der Spurenanalytik wird empfohlen, das Probevolumen bis zu 1,600 ml (0,0003 bis 0,01 g L-Ascorbinsäure/l) zu erhöhen.
- 5 Wiederfindung =  $[(2 \times \Delta E_{\text{Probe+Stand.}} - \Delta E_{\text{Probe}}) / \Delta E_{\text{Stand.}}] \times 100 [\%]$
- 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., Greenwich Ct., USA).

**Berechnung:**

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

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

$$c = (2,700 \times 176,13 \times \Delta E) / (16,9 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,2814 \times \Delta E \text{ [g L-Ascorbinsäure/l Probelösung]}}$$

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:

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

**Vorbereitung der Proben:**

Testergebnisse werden durch die untenstehenden Probeigenschaften beeinflusst. Gegebenfalls muss die entsprechende Probevorbereitung durchgeführt werden:

1. *Klare, farblose und gefärbte flüssige Proben* ggf. mit meta-Phosphorsäure, 1,5 % (w/v); pH 3,5 verdünnen, um eine Probelösung mit 0,02 bis 0,2 g L-Ascorbinsäure/l zu erhalten.
2. *Trübe Lösungen* filtrieren oder zentrifugieren, ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
3. *Kohlensäurehaltige Proben*, z. B. durch Filtration entgasen. Ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
4. *"Stark gefärbte Lösungen"*, die unverdünnt gemessen werden, mit PVPP, z. B. 1 g/100 ml, behandeln, mischen, einige Minuten inkubieren, filtrieren.
5. *Feste Proben* zerkleinern (Korngröße < 0,3 mm), bzw. halbfeste (*pastöse*) Proben homogenisieren, mit meta-Phosphorsäure, 1,5 % (w/v); pH 3,5 extrahieren, oder in meta-Phosphorsäure, 1,5 % (w/v); pH 3,5 lösen, filtrieren und ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
6. *Fetthaltige Proben* mit heißer meta-Phosphorsäure, 1,5 % (w/v); pH 3,5 (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.
7. *Proteinhaltige Proben* mit meta-Phosphorsäure, 15 % (w/v) enteiweißen; pH mit KOH (2 M) auf 3,5 bis 4,0 einstellen, mit bidest. Wasser verdünnen, bis eine meta-Phosphorsäure-Konzentration von 1,5 % (w/v) vorliegt.

Hinweis: Carrez-Klärung wegen zu geringer Wiederfindungsrate nicht anwenden.

**Eigenschaften des Tests**

1. *Spezifität:* Spezifisch für L-Ascorbinsäure. (Iso-Ascorbinsäure reagiert mit verminderter Geschwindigkeit: 20 min Reaktionszeit anstelle von 6 min für L-Ascorbinsäure). Bei der Analyse von handelsüblicher L-Ascorbinsäure sind Ergebnisse von < 100 % zu erwarten, abhängig vom Alter des Materials und den Lagerbedingungen (wegen Oxidation von L-Ascorbinsäure).
2. *Empfindlichkeit:* 0,1 mg/l ( $\Delta E = 0,005$ ;  $v = 1,600 \text{ ml}$ ;  $V = 2,700 \text{ ml}$ )
3. *Nachweisgrenze:* 0,3 mg/l ( $\Delta E = 0,015$ ;  $v = 1,600 \text{ ml}$ ;  $V = 2,700 \text{ ml}$ )
4. *Linearität:* 0,5 µg/Ansatz ( $v = 1,600 \text{ ml}$ ;  $V = 2,700 \text{ ml}$ )  
bis 20 µg/Ansatz ( $v = 0,100 \text{ ml}$ ;  $V = 2,700 \text{ ml}$ )
5. *Präzision:*  $\Delta E = \pm 0,005$  bis  $0,010$  Extinktionseinheiten  
VK = ca. 1 bis 3 %
6. *Störungen:* > 20 mg D-Sorbit/Ansatz und > 100 mg Ethanol/Ansatz hemmen AAO. > 50 µg Sulfit/Ansatz reagiert mit MTT/PMS in Form einer Schleichreaktion. Sulfit in Wein sollte durch Zugabe von Formaldehyd entfernt werden.
7. *Technische Informationen:*
  - a) Systeme mit MTT und besonders mit PMS sind lichtempfindlich.
  - b) Kräftig mischen nach Zugabe von AAO, um den Sauerstoff zu ersetzen, der in der AAO-Reaktion verbraucht wurde.
  - c) Meta-Phosphorsäure (z. B. von Merck, Darmstadt Cat. No. 546), 1,5 % (w/v), pH eingestellt auf 3,5 bis 4,0 durch Zugabe von KOH (10 M).