



**Vitamin C**  
**(L-Ascorbinsäure / L-Ascorbic Acid)**

Mikrotiterplatten-Test zur quantitativen Bestimmung von  
Vitamin C (L-Ascorbinsäure)

Microtiter plate test for the quantitative determination of  
vitamin C (L-ascorbic acid)

50 Bestimmungen  
50 reactions

Art. No.: P1010

In vitro Test  
Lagerung bei 2 - 8°C  
Storage at 2 - 8°C (35.6 - 46.4 °F)

Vertrieb / Distributor:  
R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany  
Tel.: +49 (0) 6151 - 81 02-0  
Fax.: +49 (0) 6151 - 81 02-20



Hersteller / Manufacturer:  
ifp Institut für Produktqualität GmbH, Berlin, GERMANY  
Tel.: +49 (0)30 / 74 73 33 - 0  
Fax.: +49 (0)30 / 74 73 33 - 4999





Anschrift :

R-Biopharm AG  
An der neuen Bergstraße 17  
64297 Darmstadt  
[www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)

Für weitere Fragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung:

Auftragsannahme

Tel.: 0 61 51 - 81 02-0  
Fax: 0 61 51 - 81 02-20  
E-mail: [orders@r-biopharm.de](mailto:orders@r-biopharm.de)

Marketing

Fax: 0 61 51 - 81 02-40  
E-mail: [info@r-biopharm.de](mailto:info@r-biopharm.de)

**VitaFast®**

ist ein eingetragenes Warenzeichen der ifp Institut für Produktqualität GmbH.  
ifp führt auch Auftragsanalytik durch.

Hersteller: ifp Institut für Produktqualität GmbH  
Wagner-Régeny-Str. 8, 12489 Berlin  
GERMANY  
[www.produktqualitaet.com](http://www.produktqualitaet.com)

**VitaFast®**

is a registered trademark of the ifp Institut für Produktqualität GmbH.  
ifp also carries out contract analysis.

Manufacturer: ifp Institut für Produktqualität GmbH  
Wagner-Régeny-Str. 8, 12489 Berlin  
GERMANY  
[www.produktqualitaet.com](http://www.produktqualitaet.com)

## Kurzinformation

Einfach durchzuführender enzymatischer Test im Mikrotiterplattenformat zur quantitativen Bestimmung von Vitamin C (L-Ascorbinsäure) in Lebensmitteln, pharmazeutischen Produkten und anderen Probenmaterialien. Zusätzlich kann L-Dehydroascorbinsäure bestimmt werden (siehe Application Note). Im Testkit sind alle benötigten Reagenzien enthalten inklusive eines L-Ascorbinsäurestandards für die Kalibrierung. Mit dem Test können 50 Bestimmungen (plus 4 Standardreihen) durchgeführt werden. Für die Auswertung ist ein Mikrotiterplatten-Photometer (550 - 570 nm) notwendig.

## Probenaufarbeitung

Probe homogenisieren, extrahieren, filtrieren, verdünnen

## Zeitbedarf für fünf Proben

Probenaufarbeitung:	ca. 10 - 30 min
Testdurchführung:	ca. 60 min
Auswertung:	ca. 5 min

## Testcharakteristika

Testvolumen:	320 µl
Messung in:	Mikrotiterplatte, 96 Kavitäten
Wellenlänge:	550 - 570 nm
Temperatur:	20 - 25 °C
Probeneinwaage:	1 - 20 g (ml)
Probenvolumen:	200 µl
Leerwert:	meta-Phosphorsäure
Standardbereich:	7,8 - 250 mg / 100 g (ml)
Nachweisgrenze:	= Bestimmungsgrenze
Bestimmungsgrenze:	für 1 g (ml) Probeneinwaage: 7,8 mg / 100 g (ml)
Wiederfindungsraten:	95 - 105 % (mit frisch angesetzter Ascorbinsäure)

## 1. Verwendungszweck

**VitaFast®** Vitamin C (L-Ascorbinsäure) ist ein enzymatischer Test im Mikrotiterplattenformat zur quantitativen Bestimmung von Vitamin C (L-Ascorbinsäure) in Lebensmitteln, pharmazeutischen Produkten und anderen Probenmaterialien. Darüber hinaus kann der Gesamtgehalt an Vitamin C (L-Ascorbinsäure + L-Dehydroascorbinsäure) bestimmt werden (siehe Application Note).

Die Aufarbeitung der Proben erfolgt in Anlehnung an die HPLC-Methode beschrieben durch die International Federation of Fruit Juice Producers - Method of Analysis (IFUMA) No. 17a (Rev.2005).

### Informationen zu L-Ascorbinsäure:

**Ascorbinsäure** ist ein farb- und geruchloser, kristalliner, gut wasserlöslicher Feststoff mit saurem Geschmack. Ascorbinsäure gibt es in 4 stereoisomeren Formen, aber nur L-(+)-Ascorbinsäure (auch als Vitamin C bezeichnet) weist biologische Aktivität auf. Die wichtigste Eigenschaft von L-Ascorbinsäure ist die physiologische Wirkung als Vitamin: Menschen können kein Vitamin C produzieren und brauchen es deshalb als Teil der Ernährung. Ein Mangel kann sich durch Skorbut manifestieren.

**L-Ascorbinsäure und dessen Salz, das L-Ascorbat-Anion, werden nachfolgend als Ascorbinsäure und Ascorbat bezeichnet.**

## 2. Testprinzip

Für die Bestimmung von Ascorbinsäure (welche im Probenextrakt als Ascorbat vorliegt) werden zwei Reaktionsansätze durchgeführt, basierend auf der Eigenschaft von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel zu agieren, welches durch die Abgabe von einem Elektron an ein Oxidationsmittel oxidiert werden kann.

### 1. Probenleerwert - mit Ascorbat-Oxidase (+AO)

In einem ersten Reaktionsansatz wird der Ascorbatanteil der Probe durch die Ascorbat-Oxidase (AO) in Gegenwart von Sauerstoff zu Dehydroascorbat oxidiert (Gleichung (1)).

Bei pH 3,5 reduzieren die verbleibenden reduzierenden Substanzen das Tetrazoliumsalz MTT\* in Gegenwart des Elektronenüberträgers PMS\*\* zu MTT-Formazan (Gleichung (2)). Dehydroascorbat reagiert nicht mit MTT/PMS; somit werden alle **reduzierenden Substanzen außer Ascorbat** in diesem Ansatz nachgewiesen.

### 2. Probenwert - ohne Ascorbat-Oxidase (-AO)

In einem zweiten Reaktionsansatz erfolgt der Ansatz ohne Ascorbat-Oxidase. Die **Summe an reduzierenden Substanzen inklusive Ascorbat** wird gemessen (Gleichung (2)).

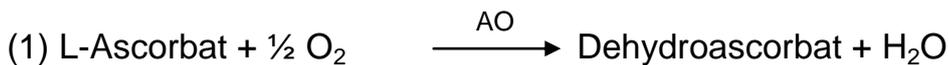
\* MTT = [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid]

\*\* PMS = (5-Methylphenaziniummethylsulfat)

Das gebildete **Formazan** im Ansatz ist der Summe an reduzierenden Substanzen proportional und wird bei 550 - 570 nm im Mikrotiterplatten-Photometer gemessen. Der Gehalt an Ascorbinsäure wird anhand der Extinktionsdifferenzen des Probenwertes minus der Extinktionsdifferenzen des Probenleerwertes berechnet. Die Auswertung erfolgt mittels einer Ascorbinsäure-Standardkurve.

Reaktionsgleichungen:

### Probenleerwert - mit Ascorbat-Oxidase (+AO)



### Probenwert - ohne Ascorbat-Oxidase (-AO)



## 3. Packungsinhalt

Alle Lösungen vor Gebrauch auf 20 - 25 °C bringen und unmittelbar vor dem Pipettieren durch vorsichtiges Schwenken mischen. Jedes Testkit enthält:

- 1 x Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (Microtiter plate with 96 wells)
- 1 x Lösung 1 (Solution 1)
  - 15 ml Phosphat-/ Citrat-Puffer (pH ca. 3,5) mit MTT
- 2 x Flasche 2 (Bottle 2) - roter Schraubverschluss
  - Ascorbat-Oxidase (AO, Lyophilisat), je ca. 250 U
  - Inhalt **einer Flasche 2** mit **0,2 ml sterilem Wasser** aus dem Testkit (siehe unten) **vollständig lösen**. 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen, dabei mehrfach mischen. Die Lösung (= **Lösung 2**) ist 8 Wochen stabil bei 2 - 8 °C. Alternativ kann Lösung 2 aliquotiert und 3 Monate bei -20 °C gelagert werden.
- 2 x Flasche 3 (Bottle 3) - grüner Schraubverschluss
  - PMS (Lyophilisat - Dunkel lagern!)
  - Inhalt **einer Flasche 3** mit **1,5 ml sterilem Wasser** aus dem Testkit (siehe unten) **vollständig lösen**. 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen, dabei mehrfach mischen. Die Lösung (= **Lösung 3**) ist 8 Wochen stabil bei 2 - 8 °C. Alternativ kann Lösung 3 aliquotiert und 3 Monate bei -20 °C gelagert werden.

- 5 x Flasche 4 (Bottle 4) - weißer Schraubverschluss  
Ascorbinsäure Standard (Lyophilisat)  
Inhalt **einer Flasche 4** unmittelbar vor Analysenbeginn in jeweils **2 ml 1,5 % meta-Phosphorsäure, pH 3,5 (= MPA) vollständig lösen**. 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen, dabei mehrfach mischen. Die Lösung (= **Lösung 4**) entspricht dem höchsten Standard (250 mg / 100 g [ml]) und wird nur frisch eingesetzt.
- 1 x Steriles Wasser (sterile water; 30 ml)  
Zum Lösen der Lyophilisate in Flaschen 2 und 3.  
Hinweis: Farbigen Deckel nach oben drücken, nach hinten bis zum Glasrand abziehen und dann durch Drehen den gesamten Verschluss entfernen.

Bemerkung: Nach Ablauf des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

## 4. Zusätzlich benötigte Geräte und Reagenzien

### 4.1 Geräte und Zubehör

- Analysenwaage
- Mikrotiterplatten-Photometer (Wellenlänge 550 - 570 nm)
- pH-Meter
- Magnetrührer
- 100 ml Bechergläser
- 100 ml Messkolben (Braunglas)
- 100 ml Schottflaschen (Braunglas)
- Trichter mit Faltenfilter
- 1,5 oder 2,0 ml Reaktionsgefäße
- Mikropipetten und Pipettenspitzen für 10 - 200 µl; 100 - 1000 µl

### 4.2 Reagenzien

- Wasser, entionisiert oder dest. (**nachfolgend Wasser genannt**)
- Meta-Phosphorsäure (1,5 % w/v, pH einstellen auf 3,5 mit KOH, ca. 10 mol / l) (**nachfolgend MPA genannt**)
- HCl, 1 mol / l  
(Stammlösung nach Anweisungen des Herstellers verdünnen)
- KOH, 10 mol / l (56,11 g Kaliumhydroxid in ca. 70 ml Wasser lösen; während des Lösens in Wasser kühlen und auffüllen auf 100 ml mit Wasser)
- KOH, 2 mol / l (KOH 10 mol / l 1 : 5 mit Wasser verdünnen)

## 5. Reagenzien und ihre Lagerung

Testkit / Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern. Zur Lagerung der gelösten Reagenzien siehe Punkt 3. PMS dunkel lagern.

## 6. Probenaufarbeitung

Proben werden in MPA (1,5 %, pH 3,5) extrahiert.

**Aufgearbeitete Proben unmittelbar für den Test einsetzen.**

1. 1 - 20 g (ml) homogene Probe einwiegen in 100 ml Becherglas.
- 2.\* Lösen in ca. 50 ml MPA mit Magnetrührer (ca. 15 min oder vollständig gelöst).
3. pH-Wert einstellen auf 3,5 - 4,0 mit HCl (1 mol / l) oder KOH (2 mol / l).
4. Quantitativ überführen in 100 ml Messkolben (Braunglas).
5. Auffüllen auf 100 ml mit MPA, mischen und filtrieren in eine 100 ml Schottflasche (Braunglas) durch einen Faltenfilter; die ersten Milliliter verwerfen.
6. Klare Lösung für den Test einsetzen.
7. Probenextrakt, wenn nötig, entsprechend dem Gehalt an Ascorbinsäure verdünnen mit MPA in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (= Verdünnungsfaktor **F**).

\* Flüssige Proben werden mit ca. 50 ml MPA verdünnt.

### Anmerkung:

- Alternativ können die Proben auch direkt in den 100 ml Messkolben eingewogen werden, vorausgesetzt, der pH-Wert der Probe in MPA (1,5 %, pH 3,5) bleibt zwischen pH 3,5 - 4. Der pH-Wert der gelösten Probe ist abhängig von der Matrix und der Probeneinwaage. Wenn die Standardprobenaufarbeitung zeigt, dass der pH einer bestimmten Probe innerhalb einer Spanne von pH 3,5 - 4 liegt, oder in diesen pH-Bereich eingestellt werden kann durch die Zugabe einer definierten Menge an HCl oder KOH, dann wird in Schritt 3 keine pH-Elektrode benötigt und die Probe kann direkt in den Messkolben eingewogen werden. Schritt 4 (quantitativer Transfer) entfällt in diesem Fall.
- Wenn in Schritt 6 keine klare Lösung vorliegt, wird eine zusätzliche Filtration durch einen Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,22 - 0,45 µm empfohlen (Spritzenfilter CME oder Spritzenvorsatzfilter PET).
- Schwer filtrierbare Matrices, wie z. B. Milchpulver, können für 5 min bei  $\geq 4.000 \times g$  zentrifugiert werden. Der gesamte Überstand wird anschließend durch einen Faltenfilter filtriert, um restliche Partikel zu entfernen.

### Tipps für die Probenverdünnung:

- Zur Berechnung der erforderlichen Verdünnung wird der **erwartete Gehalt** (in mg / 100 g [ml]) mit der **Einwaage** (in g) **multipliziert** und durch die Konzentration des **zweiten Standards** (125 mg / 100 g (ml)) **dividiert**.
- Generell gilt bei der Analyse von verdünnten Probenextrakten: Die gemessene Absorptionsdifferenz  $\Delta E$  im Probenansatz (ohne AO) sollte  $\geq 0,1$  sein. Ist  $\Delta E$  kleiner, ist die Verdünnung zu stark. In dem Fall empfiehlt es sich, die Analyse zu wiederholen und dabei den

Probenextrakt weniger stark zu verdünnen oder alternativ die Probeneinwaage zu erhöhen.

## 6.1 Beispiele für Verdünnungen des Probenextraktes

- **Fruchtgummi**, erwarteter Sollgehalt an Vitamin C: 18 mg / 100 g  
**Einwaage:** 7 g  
**Verdünnungsfaktor F** des Probenextraktes: 1 (unverdünnt)
  
- **Multivitaminbrausetablette**,  
 erwarteter Sollgehalt an Vitamin C: 1300 mg / 100 g  
**Einwaage:** 1 g  
**Verdünnungsfaktor F** des Probenextraktes:  
 Verdünnen im Verhältnis 1 : 10 (F = 10)
  
- **Eisen und Vitamin C Tablette**,  
 erwarteter Sollgehalt an Vitamin C: 30 g / 100 g  
**Einwaage:** 1 g  
**Verdünnungsfaktor F** des Probenextraktes:  
 Verdünnen im Verhältnis 1 : 240 (F = 240)

## 7. Testdurchführung / Ansatz

### 7.1 Verdünnung der Standardreihe

Eine Flasche 4 (Lyophilisat Ascorbinsäure) lösen mit 2 ml MPA (1,5 %, pH 3,5). Die resultierende Lösung (= Lösung 4) entspricht einer Ascorbinsäurekonzentration von 250 mg / 100 g (ml) und kann direkt als höchster Standard eingesetzt werden (**Standard 4**). Für die niedrigeren Standards wird **MPA** (1,5 %, pH 3,5) in 1,5 bzw. 2,0 ml Reaktionsgefäßen **vorgelegt**, wie in Tabelle 1 vorgegeben. Fortfahren gemäß Tabelle 1.

**Tabelle 1:** Verdünnung des Ascorbinsäure-Standards

Standardreihe mg / 100 g (ml)	MPA (1,5 %, pH 3,5)		Standard
Standard 4: 250	-	+	Standard 4 = Lösung 4
Standard 3: 125	500 µl	+	500 µl von 4
Standard 2: 31,3	600 µl	+	200 µl von 3
Standard 1: 7,8	600 µl	+	200 µl von 2
Leerwert: 0	Leerwert = MPA		-

### Hinweis:

Die eingesetzte Standardreihe entspricht unter Testbedingungen den angegebenen Konzentrationen, d. h. der Ascorbinsäure - Gehalt der Probe kann bei einer Einwaage von 1 g in 100 ml und ohne weitere Verdünnung des Probenextrakts direkt aus der Kalibriergeraden abgelesen werden. Nur wenn die Einwaage erhöht oder der Extrakt verdünnt wird, muss dies in der Berechnung berücksichtigt werden (s. Kapitel 8).

## 7.2 Vorbereiten der Lösungen

Zur Bestimmung des Anteils an Ascorbinsäure am gesamten reduzierenden Potential der Probe wird diese oxidativ durch die Ascorbat-Oxidase im Probenleerwert entfernt. Für jede benötigte Kavität der Mikrotiterplatte werden **95 µl Lösung 1** und **5 µl Lösung 2 (roter Schraubverschluss)** in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß **vorgemischt**. Das Gemisch ist jeweils frisch herzustellen.

**Tabelle 2:** Lösung 1 + 2 Vormischen für benötigte Anzahl an Proben (eine Pipettier-Reserve ist in der Berechnung bereits enthalten)

Anzahl Proben	Lösung 1 µl		Lösung 2 µl	Gesamt µl
1	190	+	10	200
2	285	+	15	300
3	380	+	20	400
4	475	+	25	500
5	570	+	30	600
6	665	+	35	700
7	760	+	40	800
8	855	+	45	900
9	950	+	50	1000
10	1045	+	55	1100
15	1615	+	85	1700
20	2090	+	110	2200

### Anmerkung:

Bei der Bestimmung der Summe aller reduzierenden Substanzen wird Lösung 2 nicht benötigt. Ein Vormischen von Lösung 1 und 2 entfällt.

## 7.3 Testansatz

Die einzelnen Schritte für die Ansätze sind in **Tabelle 3** dargestellt. Es sind zwei Ansätze notwendig:

### 1. Probenleerwert (+AO)

Die Bestimmung des Probenleerwertes (Bestimmung von reduzierenden Substanzen nach oxidativer Entfernung der Ascorbinsäure) erfolgt **mit** Ascorbat-Oxidase (Schritt **1.1**, Lösung 1 + 2).

### 2. Probenwert (-AO)

Die Bestimmung des Probenwertes (Bestimmung aller reduzierenden Substanzen) erfolgt **ohne** Ascorbat-Oxidase (Schritt **1.2**, nur Lösung 1).

**Anmerkung:**

- Wenn die Rohdaten nach der Messung über die VitaFast® Vitamin C Excel-Vorlage ausgewertet werden sollen (s. 8.1.1.), empfiehlt es sich, beim Pipettieren in Kavität A1 mit dem Leerwert zu beginnen und in den darunter gelegenen Kavitäten die Standards in aufsteigender Konzentration aufzutragen (also Standard 1 in Kavität B1 bis hin zu Standard 4 in Kavität E1).
- Alle Proben müssen zweimal analysiert werden: einmal im Ansatz für den Probenleerwert und einmal im Ansatz für den Probenwert
- Standards werden nur einmal analysiert - ohne AO.
- Pipettenspitze mit der zu pipettierenden Lösung immer vorspülen, auf Luftblasenfreiheit achten.
- Unmittelbar vor jeder Absorptionsmessung den Reaktionsansatz in der Mikrotiterplatte durch kreisende Bewegungen auf der Tischplatte mischen.
- Die Mikrotiterplatte wird nach der Messung gründlich mit Leitungswasser ausgespült und mit entionisiertem bzw. destilliertem Wasser nachgespült, an der Luft getrocknet und für weitere Messungen wiederverwendet.

**Tabelle 3:**

Pipettierschema zur Bestimmung des Probenleerwertes (+AO) und zur Bestimmung aller reduzierenden Substanzen (Probenwert, -AO).

Jede Spalte stellt eine Kavität dar, in der ausgehend von Schritt 1.1 bzw. 1.2 die einzelnen Arbeitsschritte nach unten bis hin zu Schritt 8 durchgeführt werden.

Schritt	Probe +AO	Probe -AO	Standard*	Anmerkungen
1.1 Lösung 1 + 2	100 µl	-	-	Auf den Boden der Kavitäten pipettieren.
1.2 Nur Lösung 1	-	100 µl	100 µl	
2. Standard*	-	-	200 µl	Auf den Boden der Kavitäten pipettieren; mischen durch einmaliges Auf- und Abpipettieren.
3. Probe	200 µl	200 µl	-	
<b>4. Inkubation 20 min im Dunkeln bei 20 - 25 °C.</b>				
<b>5. Messung E1</b>	E1 <sub>Proben-leerwert</sub>	E1 <sub>Probe</sub>	E1 <sub>Standard</sub>	Ansatz durch kreisende Bewegungen auf der Tischplatte mischen, Extinktion sofort bei 550 - 570 nm messen.
6. Lösung 3 ( grüner Schraubverschluss ) → <b>Start der Reaktion</b>	20 µl	20 µl	20 µl	Zugeben und vorsichtig durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren mischen.
<b>7. Inkubation 30 min im Dunkeln bei 20 - 25 °C.</b>				
<b>8. Messung E2**</b>	E2 <sub>Proben-leerwert</sub>	E2 <sub>Probe</sub>	E2 <sub>Standard</sub>	Ansatz durch kreisende Bewegungen auf der Tischplatte mischen, Extinktion sofort bei 550 - 570 nm messen.

\* 5 einzelne Kavitäten: jeweils eine für den Leerwert und jeden Standard (1 - 4)

\*\* Die Reaktion ist abgeschlossen, wenn die gemessene Extinktion konstant bleibt; das ist für gewöhnlich der Fall nach 30 Minuten.

## 8. Auswertung

Die Absorptionsdifferenz  $\Delta E = E2 - E1$  wird für Standards und Proben für jeden Ansatz berechnet. Für jeden Standard wird der  $\Delta E$ -Wert des **Leerwertes** vom  $\Delta E$  des jeweiligen **Standards** subtrahiert.

Für jede Probe wird das  $\Delta E$  des **Probenleerwertes** vom  $\Delta E$  des **Probenwertes** abgezogen. In Tabelle 4 ist die Auswertung des Testansatzes im Detail dargestellt.

**Tabelle 4:** Auswerteschema des Pipettieransatzes für reduzierende Substanzen ohne Ascorbat (Probenleerwert mit AO) und Summe aller reduzierenden Substanzen (Probenwert ohne AO)

	E1	E2	$\Delta E$
<b>Standard</b>			
Leerwert	$E1_{\text{Leerwert}}$	$E2_{\text{Leerwert}}$	$(E2_{\text{Leerwert}} - E1_{\text{Leerwert}})$
7,8 mg / 100 g (ml)	$E1_{7,8}$	$E2_{7,8}$	$(E2_{7,8} - E1_{7,8}) - \Delta E_{\text{Leerwert}}$
31,3 mg / 100 g (ml)	$E1_{31,3}$	$E2_{31,3}$	$(E2_{31,3} - E1_{31,3}) - \Delta E_{\text{Leerwert}}$
125 mg / 100 g (ml)	$E1_{125}$	$E2_{125}$	$(E2_{125} - E1_{125}) - \Delta E_{\text{Leerwert}}$
250 mg / 100 g (ml)	$E1_{250}$	$E2_{250}$	$(E2_{250} - E1_{250}) - \Delta E_{\text{Leerwert}}$
<b>Probe</b>			
Probe <sub>Leerwert</sub>	$E1_{\text{Probenleerwert}}$	$E2_{\text{Probenleerwert}}$	$(E2_{\text{Probenleerwert}} - E1_{\text{Probenleerwert}})$
Probe	$E1_{\text{Probe}}$	$E2_{\text{Probe}}$	$(E2_{\text{Probe}} - A1_{\text{Probe}}) - \Delta E_{\text{Probenleerwert}}$

Die  $\Delta E$ -Werte der **Standards** werden in einem **Diagramm** gegen die Konzentration der Standards aufgetragen. Mittels linearer Regression wird die **Geradengleichung** (3) ermittelt und nach Ascorbinsäure [mg / 100 g (ml)] aufgelöst (4). Die  $\Delta E$ -Werte der Probe (=  $\Delta E$  ohne AO -  $\Delta E$  mit AO) werden in die Gleichung eingesetzt und der Gehalt an Ascorbinsäure bestimmt.

(3)  $\Delta E = \text{Steigung} \times \text{Ascorbinsäure [mg / 100 g (ml)]} + y\text{-Achsenabschnitt}$

(4)  $\text{Ascorbinsäure [mg / 100 g (ml)]} = \frac{(\Delta E \text{ Probe} - y\text{-Achsenabschnitt}) \times F}{\text{Steigung} \times \text{Probeneinwaage [g (ml)]}}$

F = Verdünnungsfaktor des Probenextraktes

### 8.1 Weitere Auswertungsmöglichkeiten

#### 8.1.1 Excel-Auswertebblatt

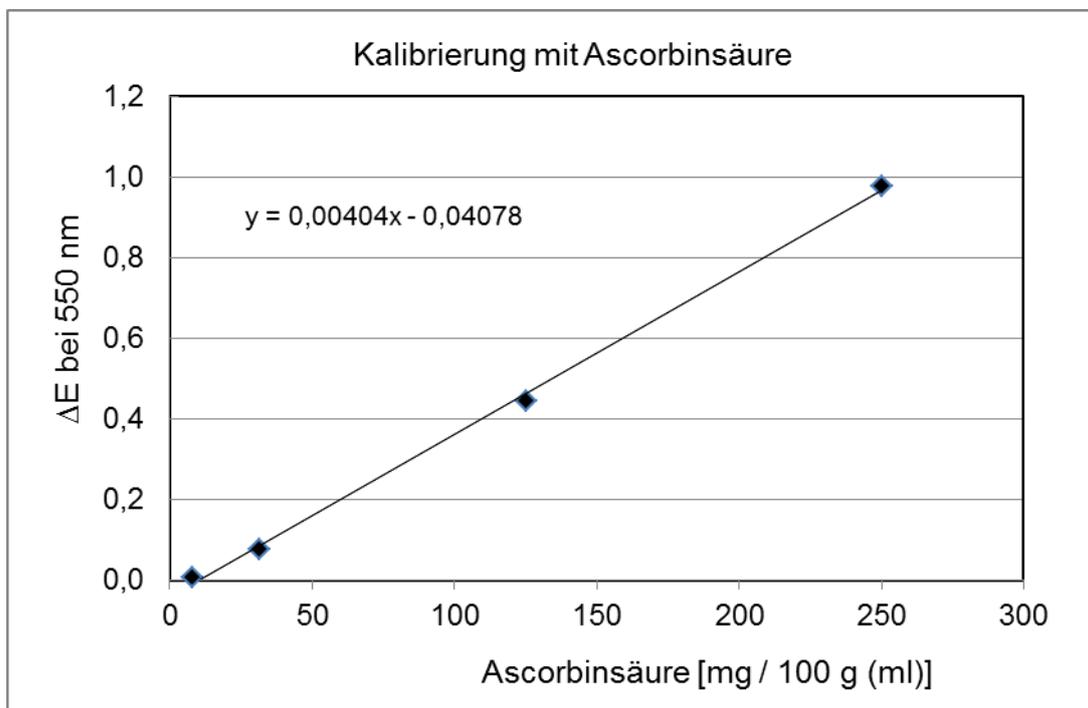
Alternativ zur manuellen Auswertung gemäß Abschnitt 8 können die Rohdaten in das VitaFast<sup>®</sup> Excel-Auswertebblatt für Ascorbinsäure eingetragen werden. Die Ergebnisse werden dann automatisch berechnet. Das Auswertebblatt ist auf Anfrage erhältlich.

## 8.2 Auswertungsbeispiel

Das folgende Beispiel zeigt die Auswertung anhand eines Multivitaminsaftes. Der deklarierte Gehalt an Ascorbinsäure liegt bei 35 mg / 100 ml. Das eingesetzte Probenvolumen beträgt 10 ml und der Probenextrakt wurde in einer 1 : 3 Verdünnung eingesetzt. Die Rohdaten aus den Ansätzen mit und ohne Ascorbat-Oxidase sind in Tabelle 5 gezeigt. Die daraus berechnete Kalibriergerade ist in Abb. 1 dargestellt. Durch Einsetzen von  $\Delta E_{\text{Probe}}$  in Gleichung (4) wird der Ascorbinsäuregehalt berechnet.

**Tabelle 5:**  
Auswertungsbeispiel des Pipettieransatzes

	E1	E2	$\Delta E$
<b>Standard</b>			
Leerwert	0,047	0,050	$(E2_{\text{Leer}} - E1_{\text{Leer}}) = 0,003$
7,8 mg / 100 g (ml)	0,050	0,061	$(E2_{7,8} - E1_{7,8}) - \Delta E_{\text{Leerwert}} = 0,008$
31,3 mg / 100 g (ml)	0,050	0,130	$(E2_{31,3} - E1_{31,3}) - \Delta E_{\text{Leerwert}} = 0,077$
125 mg / 100 g (ml)	0,053	0,502	$(E2_{125} - E1_{125}) - \Delta E_{\text{Leerwert}} = 0,446$
250 mg / 100 g (ml)	0,054	1,036	$(E2_{250} - E1_{250}) - \Delta E_{\text{Leerwert}} = 0,979$
<b>Probe</b>			
			<b><math>\Delta E</math> Probe</b>
Probe <sub>Leerwert</sub>	0,085	0,109	$(E2_{\text{Probenleerwert}} - E1_{\text{Probenleerwert}}) = 0,024$
Probe	0,081	0,559	$(E2_{\text{Probe}} - E1_{\text{Probe}}) - \Delta E_{\text{Probenleerwert}} = 0,454$



**Abb. 1:**  
Standardkurve zur Bestimmung von Ascorbinsäure  
(Steigung = 0,00404; Achsenabschnitt = -0,04078)

## Ergebnis für die Ascorbinsäure-Probe

$$(4) \text{ Ascorbinsäure [mg / 100 g]} = \frac{(0,454 - [-0,04078]) \times 3}{0,00404 \times 10 \text{ ml}} = 36,7$$

## 9. Testeigenschaften

### 9.1 Spezifität

Der Test ist spezifisch für L-Ascorbinsäure unter Testbedingungen. Zusätzlich wird auch Isoascorbinsäure (D-Ascorbinsäure, Erythorbinsäure) erfasst, welche nicht natürlich vorkommt. Als synthetischer Zusatzstoff E 315 ist Isoascorbinsäure in der EU ausschließlich für einige Fleisch- und Fisch-erzeugnisse sowie für wärmebehandelte Sahne zugelassen.

### 9.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

#### 9.2.1 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze entspricht der Bestimmungsgrenze (niedrigster Standard).

#### 9.2.2 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze wird definiert als Konzentration des niedrigsten Standards.

Unter Standardtestbedingungen (Probeneinwaage 1 g [ml], Probenextrakt unverdünnt):

- 7,8 mg / 100 g (ml)

### 9.3 Wiederfindungsraten

Mit frisch angesetzter Ascorbinsäure (luftdicht und dunkel aufbewahrt) betragen die Wiederfindungsraten im Durchschnitt 95 - 105 %. Da jedoch die Wiederfindungsraten von Ascorbinsäure in realen Lebensmittelmatrices abhängig sind von den Lagerungsbedingungen, der Qualität des Lösemittels zur Extraktion / Verdünnung, dem Alter der Extraktion / Probe, der Exposition gegenüber Licht / Sauerstoff und anderen Faktoren, sind Wiederfindungen von unter 95 % nicht ungewöhnlich und weisen nicht auf eine unzureichende enzymatische Reaktionseffizienz hin.

## 10. Literatur

Die beschriebene Probenaufarbeitungsmethode entspricht den Anforderungen der International Federation of Fruit Juice Producers - Methods of Analysis (IFUMA).

**IFUMA17A:** Determination of ascorbic acid by HPLC (1987; rev. 2005)

**Beutler, H. O. (1984)** in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., Vol. VI, pp. 376-385, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach / Florida, Basel

## 11. Abkürzungen

AO	Ascorbat-Oxidase
E	Extinktion
$\Delta E$	Extinktionsdifferenz
IFU	International Federation of Fruit Juice Producers
IFUMA	International Federation of Fruit Juice Producers - Method of Analysis
KOH	Kaliumhydroxid
MTT	[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid]
PMS	(5-Methylphenaziniummethylsulfat)

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. R-Biopharm übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

# VitaFast<sup>®</sup> Vitamin C (L-Ascorbic Acid)

## Brief information

Easy to conduct enzymatic test in microtiter plate format for the quantitative determination of vitamin C (L-ascorbic acid) in food, pharmaceutical products and other sample material. Additionally L-dehydroascorbic acid can be detected (see application note). The kit contains all the required reagents including an L-ascorbic acid standard for the standard curve. 50 reactions (plus four calibration curves) can be carried out. For evaluation you will need a microtiter plate photometer (550 - 570 nm).

## Sample preparation

Homogenise, extract, filter, dilute

## Time required for five samples

Sample preparation: approx. 10 - 30 min  
Conducting the test: approx. 60 min  
Evaluation: approx. 5 min

## Test characteristics

Test volume: 320 µl  
Measurement in: microtiter plate, 96 wells  
Wavelength: 550 - 570 nm  
Temperature: 20 - 25 °C  
Weighed sample: 1 - 20 g (ml)  
Sample volume: 200 µl  
Blank measurement: meta-phosphoric acid  
Standard range: 7.8 - 250 mg / 100 g (ml)  
Detection limit = quantification limit  
Quantification limit: for 1 g (ml) weighed sample:  
7.8 mg / 100 g (ml)  
Recovery rates: 95 - 105 % (with freshly prepared ascorbic acid)

## 1. Intended use

**VitaFast®** Vitamin C (L-Ascorbic Acid) is a test in microtiter plate format for the quantitative determination of vitamin C (L-ascorbic acid) in foods, pharmaceutical products and other sample material. Furthermore the total amount of vitamin C (L-ascorbic acid + L-dehydroascorbic acid) can be detected (see application note).

Sample preparation is carried out according to the HPLC method presented by the International Federation of Fruit Juice Producers - Methods of Analysis (IFUMA) No. 17a (Rev.2005).

### Information on L-ascorbic acid:

**Ascorbic acid** is a clear, odourless, crystalline solid substance which has a sour flavour. There are four stereoisomeric variants but only L-(+)-ascorbic acid (also referred to as vitamin C) is biologically active. Its vitamin activity is the most relevant property of L-ascorbic acid: humans cannot produce vitamin C and require it as part of their nutrition. A deficiency can result in the manifestation of scurvy.

L-ascorbic acid and its salt, the anion L-ascorbate, will hereinafter be referred to as ascorbic acid and ascorbate, respectively.

## 2. Principle of the test

Two assays are performed to determine ascorbic acid (which is present in the sample extract as ascorbate) based on its property of being a reductant that can be oxidised by donating an electron to an oxidising agent (oxidant):

### 1. Sample blank assay - with Ascorbate Oxidase (+AO)

In the first assay the ascorbate fraction of the sample is oxidised to dehydroascorbate by ascorbate oxidase (AO) in the presence of oxygen (Equation (1)).

At pH 3.5, the remaining reductants in the assay reduce the tetrazolium salt MTT\* to MTT-Formazan in the presence of the electron carrier PMS\*\* (Equation (2)). Dehydroascorbate does not react with MTT / PMS; hence **only the non-ascorbate reductants** are measured in this assay.

### 2. Sample assay - without Ascorbate Oxidase (-AO)

In the second assay the AO step is omitted. Thus, the **total sum of reductants including ascorbate** is measured according to Equation (2).

\* MTT = [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

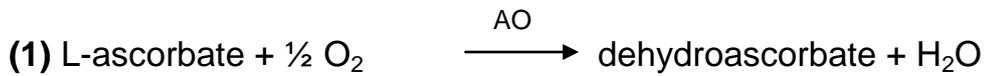
\*\* PMS = (5-methylphenazinium methosulphate)

The **formazan** formed in the assays is proportional to the sum of reductants and is measured at 550 - 570 nm in a microtiter plate photometer. The ascorbic acid content can be calculated based on the absorbance difference

of the sample assay minus the absorbance difference of the sample blank assay. Results are evaluated based on an ascorbic acid standard curve.

The following reactions take place:

### Sample blank assay - with Ascorbate Oxidase (+AO)



### Sample assay - without Ascorbate Oxidase (-AO)



## 3. Contents of the test kit

Bring all solutions to 20 - 25 °C prior to use and blend by carefully swirling around prior to pipetting. Each test kit contains:

1 x Microtiter plate with 96 wells

1 x Solution 1

15 ml phosphate / citrate buffer (pH approx. 3.5) with MTT

2 x Bottle 2 - red screw cap

Ascorbate oxidase (AO, lyophilisate), approx. 250 U each

**Fully dissolve** the content of **one Bottle 2** with **0.2 ml sterile water** from the test kit (see below). Leave at room temperature for 10 min, swirl several times. The solution (= **Solution 2**) will remain stable for eight weeks if stored at 2 - 8 °C. Alternatively, Solution 2 can be aliquoted and stored at -20 °C for three months.

2 x Bottle 3 - green screw cap

PMS (lyophilisate - Keep dark!)

**Fully dissolve** the content of **one Bottle 3** with **1.5 ml sterile water** from the test kit (see below). Leave at room temperature for 10 min, swirl several times. The solution (= **Solution 3**) will remain stable for eight weeks if stored at 2 - 8 °C. Alternatively, Solution 3 can be aliquoted and stored at -20 °C for three months.

5 x Bottle 4 - white screw cap

Ascorbic acid standard (lyophilisate)

**Fully dissolve** the content of **one Bottle 4** with **2 ml 1.5 % meta-phosphoric acid, pH 3.5 (= MPA)**, directly before use. The solution (= **Solution 4**) corresponds to the highest standard (250 mg / 100 g [ml]) and must be used **fresh only**. Discard the remaining solution after conducting the test.

1 x Sterile water (30 ml)

For dissolving the lyophilisate in Bottles 2 and 3.

Note: Push the coloured lid up, pull off right up to the glass rim and turn entire lid to remove it.

Remark: after the expiry date no guarantee of quality

## 4. Required devices and reagents, not provided

### 4.1 Devices and accessories

- Analytical scale
- Microtiter plate photometer (550 - 570 nm wavelength)
- pH meter
- Magnetic stirrer
- 100 ml beakers
- 100 ml volumetric flask (brown glass)
- 100 ml Schott glass bottles (brown glass)
- Funnel and pleated filter
- 1.5 and 2.0 ml reaction vials
- Micropipettes and pipette tips 10 - 200 µl; 100 - 1000 µl

### 4.2 Reagents

- Distilled or deionised water (**referred to as water hereinafter**)
- Meta-phosphoric acid (1.5 % w/v, pH adjusted to 3.5 with KOH, approx. 10 mol / l) (**referred to as MPA hereinafter**)
- HCl, 1 mol / l (dilute stock solution according to supplier's instructions)
- KOH, 10 mol / l (dissolve 56.11 g potassium hydroxide in approx. 70 ml water (cool while dissolving in water) and top up to 100 ml with water)
- KOH, 2 mol / l (dilute the 10 mol / l solution 1 : 5 with water)

## 5. Storage instructions

Store the test kit / the reagents at 2 - 8 °C. See Section 3 for storage instructions applicable to dissolved reagents. Store PMS in the dark.

## 6. Sample preparation

Samples are extracted in MPA (1.5 %, pH 3.5).

**Use the samples prepared in this way directly for the assay.**

1. Weigh 1 - 20 g (ml) of homogenized sample into a 100 ml beaker.
- 2.\* Dissolve in approx. 50 ml MPA using a magnetic stirrer (approx. 15 min or until completely dissolved).
3. Adjust pH to 3.5 - 4.0 with HCl (1 mol / l) or KOH (2 mol / l).
4. Transfer quantitatively to a 100 ml volumetric flask (brown glass).
5. Top up to 100 ml with MPA, mix and filter into a 100 ml Schott glass bottle (brown glass) through a pleated filter; discard the first millilitres.
6. Use clear solution for the test.
7. If necessary, dilute the sample extract with MPA in 1.5 ml reaction vials, depending on the ascorbic acid concentration (= **dilution factor F**).

\* Dilute liquid samples with approx. 50 ml MPA.

### Notes:

- Alternatively, samples can be weighed directly into the 100 ml volumetric flask, provided that the sample dissolved in MPA (1.5 %, pH 3.5) stays at pH 3.5 - 4. The pH of the dissolved sample depends on the matrix and on the sample weight. If the standard sample preparation procedure shows that the pH of a specific sample is within the range of 3.5 - 4, or can be adjusted to this range by adding a defined volume of HCl or KOH, the pH electrode is not necessary for step 3 and the sample can be weighed directly into the volumetric flask. Step 4 (quantitative transfer) is omitted.
- If the solution is not clear at step 6, a fine mesh filtration using a 0.22 - 0.45  $\mu\text{m}$  filter is recommended (syringe filter CME or polyester syringe filters).
- Matrices that are not easy to filter, such as milk powder, can be centrifuged for 5 min at  $\geq 4,000 \times g$ . Filter the entire supernatant through a pleated filter afterwards to eliminate remaining particles.

### Tips for sample dilution:

- To calculate the required dilution, the **expected content** (in mg / 100 g [ml]) is **multiplied** by the **sample weight** (in g) and **divided** by the concentration of the **second standard** (125 mg / 100 g (ml)).
- Generally, the following applies to the analysis of diluted sample extracts: the absorbance difference  $\Delta A$  measured in the sample assay (i. e. the total reductants assay without AO) should be  $\geq 0.1$ . If  $\Delta A$  is smaller, the dilution is too strong. In that case it is recommendable to repeat the analysis with a less strongly diluted sample extract or with an increased amount of weighed sample.

## 6.1 Examples of sample extract dilution

- **Fruit gum**, expected vitamin C content: 18 mg / 100 g  
**Weighed sample:** 7 g  
**Dilution factor F** of the sample extract: 1 (undiluted)
- **Multivitamin effervescent tablet**,  
expected vitamin C content: 1,300 mg / 100 g  
**Weighed sample:** 1 g  
**Dilution factor F** of the sample extract: dilute to a ratio of 1 : 10 (F = 10)
- **Iron and vitamin C tablet**, expected vitamin C content: 30 g / 100 g  
**Weighed sample:** 1 g  
**Dilution factor F** of the sample extract: dilute to a ratio of 1:240 (F = 240)

## 7. Test procedure / assay setup

### 7.1 Dilution of the standard

**Dissolve 1 x Bottle 4** (ascorbic acid lyophilisate) with 2 ml MPA (1.5 %, pH 3.5). The resulting solution (= Solution 4) corresponds to an ascorbic acid concentration of 250 mg / 100 g (ml) and can be used directly as the highest standard (**standard 4**).

For the lower standards, **dispense MPA**( 1.5 %, pH 3.5) into 1.5 or 2.0 ml reaction vials, as specified in Table 1. Continue as shown in Table 1.

**Table 1:** Dilution of the ascorbic acid standard

<b>Standard series mg / 100 g (ml)</b>	<b>MPA (1.5 %, pH 3.5)</b>		<b>Standard</b>
standard 4: 250	-		standard 4 = Solution 4
standard 3: 125	500 µl	+	500 µl from 4
standard 2: 31.3	600 µl	+	200 µl from 3
standard 1: 7.8	600 µl	+	200 µl from 2
blank: 0	blank = MPA		-

#### **Note:**

The standard series corresponds to the specified concentrations under standard test conditions, i. e. with a weighed sample of 1 g in 100 ml and without further dilution of the sample extract, the sample's ascorbic acid content can be read directly from the calibration curve. Only if the amount of weighed sample is increased, or if the extract is diluted must this be taken into account in the calculation (see Section 8).

## 7.2 Preparation of solutions

In order to determine the ascorbate fraction of the total reducing potential of the sample, ascorbic acid must be removed oxidatively by ascorbate oxidase in the sample blank assay. For each required well of the microtiter plate, **mix 95 µl of Solution 1** and **5 µl of Solution 2** (red screw cap) in a 1.5 ml reaction vial (see Table 2 for examples). The mixture must be prepared freshly prior to each assay setup and is discarded afterwards.

**Table 2:** Premix Solutions 1 + 2 for the required number of samples (a pipetting reserve is already included in the calculation below)

Number of samples	Solution 1 µl		Solution 2 µl	Total µl
1	190	+	10	200
2	285	+	15	300
3	380	+	20	400
4	475	+	25	500
5	570	+	30	600
6	665	+	35	700
7	760	+	40	800
8	855	+	45	900
9	950	+	50	1,000
10	1,045	+	55	1,100
15	1,615	+	85	1,700
20	2,090	+	110	2,200

### Note:

Solution 2 is not needed for the determination of the total sum of reductants. Hence, it is not necessary to mix Solutions 1 and 2 for the sample assay.

## 7.3 Assay setup

The individual steps for preparing the assays are shown in **Table 3**. You need to prepare two assays:

### 1. Sample blank assay (+AO)

The sample blank assay (determination of non-ascorbate reductants after oxidative removal of ascorbic acid) is prepared **with** ascorbate oxidase (step 1.1, Solution 1 + 2).

### 2. Sample assay (-AO)

The sample assay (determination of the total sum of reductants) is prepared **without** ascorbate oxidase (step 1.2, only Solution 1).

### Note:

- If the VitaFast<sup>®</sup> Vitamin C excel evaluation sheet is used for evaluation after the measurements (see 8.1.1.), it is recommended to begin pipetting by starting with the blank in well A1, followed in a downward direction by the standards in increasing concentration (i.e. standard 1 in well B1 all the way through standard 4 in well E1).

- All samples need to be performed twice: once in the sample blank assay and once in the sample assay.
- Standards need to be performed only once - without AO.
- Always rinse the pipette tip with the solution to be pipetted first and make sure it contains no air bubbles.
- Prior to each absorption measurement, mix the assay in the microtiter plate by gently swirling the plate on the tabletop.
- After the measurements, rinse the microtiter plate thoroughly with tap water followed by deionised or distilled water, and then leave to air dry before using again.

**Table 3:**

Pipetting scheme for the determination of non-ascorbate reductants (sample blank, +AO) and total reductants (sample, -AO).

Each column represents one microwell in which the single working steps starting from 1.1 or 1.2, respectively, are carried out in a downward direction all the way through step 8.

Step	Sample +AO	Sample -AO	Standard*	Notes
1.1 Solution 1 + 2	100 µl	-	-	Dispense onto the <b>bottom</b> of the wells.
1.2 Only Solution 1	-	100 µl	100 µl	
2. Standard*	-	-	200 µl	Add to the bottom of the wells, mix by pipetting up and down once.
3. Sample	200 µl	200 µl	-	
<b>4. Incubate in the dark for 20 min at 20 - 25 °C.</b>				
<b>5. Measurement A1</b>	A1 <sub>sample blank</sub>	A1 <sub>sample</sub>	A1 <sub>standard</sub>	Mix assay by swirling plate on the tabletop, measure absorbance at 550 - 570 nm immediately afterwards.
6. Solution 3 (green screw cap) → <b>Start of reaction</b>	20 µl	20 µl	20 µl	Add and mix by pipetting up and down three times; additionally use pipette tip to stir assay in well.
<b>7. Incubate in the dark for 30 min at 20 - 25 °C.</b>				
<b>8. Measurement A2**</b>	A2 <sub>sample blank</sub>	A2 <sub>sample</sub>	A2 <sub>standard</sub>	Mix assay by swirling plate on the tabletop, measure absorbance at 550 - 570 nm immediately afterwards.

\* Five separate wells: one for the blank and for each standard (1 - 4)

\*\* The reaction is complete when the measured absorbance remains constant; this is usually the case after 30 minutes.

## 8. Evaluation

The absorbance difference  $\Delta A = A2 - A1$  is calculated for the standards and samples in each assay. For each standard, the  $\Delta A$  from the **blank** is then **subtracted** from the  $\Delta A$  **standard** measured in the **sample assay**.

For each sample, the  $\Delta A$  from the **sample blank assay** is **subtracted** from the  $\Delta A$  measured in the **sample assay**. Table 4 shows a detailed evaluation of the test assay.

**Table 4:**

Evaluation scheme of the pipetting assays for non-ascorbate reductants (sample blank assay with AO) and total reductants (sample assay without AO)

	A1	A2	$\Delta A$
<b>Standard</b>			
blank	$A1_{\text{blank}}$	$A2_{\text{blank}}$	$(A2_{\text{blank}} - A1_{\text{blank}})$
7.8 mg / 100 g (ml)	$A1_{7.8}$	$A2_{7.8}$	$(A2_{7.8} - A1_{7.8}) - \Delta A_{\text{blank}}$
31.3 mg / 100 g (ml)	$A1_{31.3}$	$A2_{31.3}$	$(A2_{31.3} - A1_{31.3}) - \Delta A_{\text{blank}}$
125 mg / 100 g (ml)	$A1_{125}$	$A2_{125}$	$(A2_{125} - A1_{125}) - \Delta A_{\text{blank}}$
250 mg / 100 g (ml)	$A1_{250}$	$A2_{250}$	$(A2_{250} - A1_{250}) - \Delta A_{\text{blank}}$
<b>Sample</b>			
sample <sub>blank</sub>	$A1_{\text{sampleblank}}$	$A2_{\text{sampleblank}}$	$(A2_{\text{sampleblank}} - A1_{\text{sampleblank}})$
sample	$A1_{\text{sample}}$	$A2_{\text{sample}}$	$(A2_{\text{sample}} - A1_{\text{sample}}) - \Delta A_{\text{sampleblank}}$

The  $\Delta A$  values of the standards are plotted against the concentration of the standards in a **diagram**. Linear regression is used to determine the **linear equation** (3), which is then solved for ascorbic acid [mg / 100 g (ml)] (4). The values of  $\Delta A$  sample (=  $\Delta A$  without AO -  $\Delta A$  with AO) are then substituted into the equation in order to calculate the ascorbic acid content.

$$(3) \Delta A = \text{slope} \times \text{ascorbic acid [mg / 100 g (ml)]} + \text{y-intercept}$$

$$(4) \text{Ascorbic acid [mg / 100 g (ml)]} = \frac{(\Delta A \text{ sample} - \text{y-intercept}) \times F}{\text{slope} \times \text{weighed sample [g (ml)]}}$$

F = Dilution factor of the sample extract

### 8.1 Additional evaluation options

#### 8.1.1 Excel evaluation sheet

Along with the manual evaluation as per Section 8, the raw data can be entered in the VitaFast<sup>®</sup> Excel evaluation sheet for ascorbic acid. The results are then calculated automatically. The evaluation sheet is available on request.

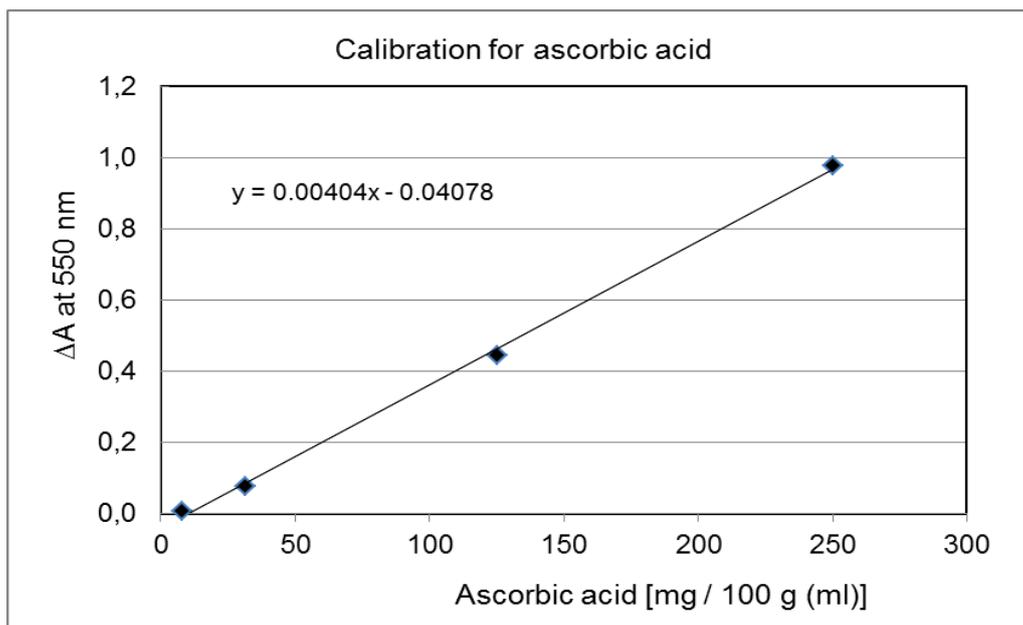
## 8.2 Evaluation example

The following example illustrates the evaluation procedure based on multivitamin juice. The expected ascorbic acid content is 35 mg / 100 ml. The sample volume is 10 ml, and the sample extract was used in a 1 : 3 dilution. The raw data from the sample blank assay and the sample assay are shown in Table 5. The calibration curve calculated from this is shown in Fig. 1. The ascorbic acid content is calculated by substituting  $\Delta A_{\text{sample}}$  in Equation (4).

**Table 5:**

Evaluation example of the pipetting assays

	A1	A2	$\Delta A$
<b>Standard</b>			
blank	0.047	0.050	$(A2_{\text{blank}} - A1_{\text{blank}}) = 0.003$
7.8 mg / 100 g (ml)	0.050	0.061	$(A2_{7.8} - A1_{7.8}) - \Delta A_{\text{blank}} = 0.008$
31.3 mg / 100 g (ml)	0.050	0.130	$(A2_{31.3} - A1_{31.3}) - \Delta A_{\text{blank}} = 0.077$
125 mg / 100 g (ml)	0.053	0.502	$(A2_{125} - A1_{125}) - \Delta A_{\text{blank}} = 0.446$
250 mg / 100 g (ml)	0.054	1.036	$(A2_{250} - A1_{250}) - \Delta A_{\text{blank}} = 0.979$
<b>Sample</b>			
Sample <sub>blank</sub>	0.085	0.109	$(A2_{\text{sampleblank}} - A1_{\text{sampleblank}}) = 0.024$
Sample	0.081	0.559	$(A2_{\text{sample}} - A1_{\text{sample}}) - \Delta A_{\text{sampleblank}} = 0.454$



**Fig. 1:**

Standard curve for the determination of ascorbic acid (slope = 0.00404; y-intercept = -0.04078)

## ▪ Result for the ascorbic acid sample

$$(4) \text{ Ascorbic acid [mg / 100 ml]} = \frac{(0.454 - [-0.04078]) \times 3}{0.00404 \times 10 \text{ ml}} = 36.7$$

## 9. Test properties

### 9.1 Specificity

Under test conditions, the assay is specific for L-ascorbic acid. Additionally, isoascorbic acid (erythorbic acid, D-ascorbic acid), which does not occur naturally, is detected. In the European Union, isoascorbic acid is approved exclusively as a synthetic food additive (E 315) in certain meat and fish products and in heat-treated cream.

### 9.2 Quantification and detection limit

#### 9.2.1 Limit of detection

The detection limit equals the quantification limit (lowest standard).

#### 9.2.2 Limit of quantification

The quantification limit is defined as the concentration of the lowest standard.

Under standard test conditions (weighed sample of 1 g [ml], sample extract undiluted):

- 7.8 mg / 100 g (ml)

### 9.3 Recovery rates

With freshly prepared ascorbic acid (kept airtight and dark), recovery rates are 95 - 105 % on average. However, since the recovery of ascorbic acid from real food matrices depends on storage conditions, the quality of the solvent used for extraction / dilution, the age of the preparation / sample, its exposure to light / oxygen, and other factors, recovery rates below 95 % are not uncommon and do not indicate an insufficient enzymatic reaction efficiency.

## 10. Bibliography

The described sample preparation method complies with the requirements of the International Federation of Fruit Juice Producers - Methods of Analysis (IFUMA).

**IFUMA17A:** Determination of ascorbic acid by HPLC (1987; rev. 2005)

**Beutler, H. O. (1984)** in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., Vol. VI, pp. 376-385, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach / Florida, Basel

## 11. Abbreviations

AO	Ascorbate oxidase
A	Absorbance
$\Delta A$	Absorbance difference
IFU	International Federation of Fruit Juice Producers
IFUMA	International Federation of Fruit Juice Producers - Method of Analysis
KOH	Potassium hydroxide
MTT	[3-(4,5 – dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]
PMS	5-methylphenazinium methosulphate

R-Biopharm makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, R-Biopharm will provide a replacement product. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. R-Biopharm shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.







