

D-Äpfelsäure (D-Malat)

BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM
Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik

UV-Test

zur Bestimmung von D-Äpfelsäure in Lebensmitteln und anderen Probematerialien

Best. Nr. 11 215 558 035

Test-Combination für 3 × 11 Bestimmungen

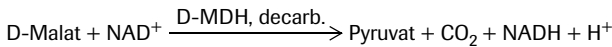
Nur zur Verwendung in der Lebensmittelhygiene.

Lagern bei 2-8°C

Methoden-Empfehlungen und standardisierte Verfahren siehe unter Literatur (2)

Prinzip (Lit. 1)

D-Äpfelsäure (D-Malat) wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart von decarboxylierender D-Malat-Dehydrogenase (D-MDH, decarb.) zu Oxalacetat oxidiert, welches unmittelbar von diesem Enzym in Pyruvat und Kohlendioxid gespalten wird.



Die bei der Reaktion gebildete NADH-Menge ist der D-Äpfelsäure-Menge äquivalent. NADH ist Messgröße und aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm zu bestimmen.

Die Test-Combination enthält

1. Flasche 1 mit ca. 30 ml Lösung, zusammengesetzt aus: Hepes¹-Puffer, pH ca. 9,0
2. Flasche 2 mit ca. 210 mg NAD-Lyophilisat
3. Drei Flaschen 3 mit D-MDH, decarb., Lyophilisat, je ca. 8 U
4. Flasche 4 mit D-Äpfelsäure-Testkontroll-Lösung zur Testkontrolle (Die Messung der Testkontroll-Lösung ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen.) Testkontroll-Lösung unverdünnt verwenden. (Verwendbar bis: s. Packungsetikett).

Herstellung der Lösungen

1. Inhalt der Flasche 1 unverdünnt verwenden.
2. Inhalt der Flasche 2 mit 4 ml bidest. Wasser lösen.
3. Inhalt einer Flasche 3 mit 0,6 ml bidest. Wasser lösen.

Stabilität der Reagenzien

Der Inhalt der Flasche 1 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett). Lösung 1 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.

Der Inhalt der Flasche 2 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett). Lösung 2 ist bei 2-8°C 3 Wochen, bei -15 bis -25°C 2 Monate haltbar.

Der Inhalt der Flasche 3 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett). Lösung 3 ist bei 2-8°C 5 Tage haltbar.

Bestimmungsansatz

Wellenlänge²: 340 nm, Hg 365 nm oder Hg 334 nm
 Glasküvette³: 1,00 cm Schichtdicke
 Temperatur: 20-25°C
 Testvolumen: 2,950 ml

Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette) oder gegen Wasser
 Probelösung: 1-50 µg D-Äpfelsäure/Testansatz⁴ (in 0,100-1,800 ml Probevolumen)

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Lösung 1	1,000 ml	1,000 ml
Lösung 2	0,100 ml	0,100 ml
Probelösung* bidest. Wasser	-	0,100 ml
	1,800 ml	1,700 ml
mischen**, nach ca. 6 min Extinktionen der Lösungen messen (E ₁). Reaktion starten durch Zugabe von		
Lösung 3	0,050 ml	0,050 ml
mischen**, nach Ablauf der Reaktion (ca. 20 min) Extinktionen von Leerwert und Probe messen (E ₂).		

* Vor der Dosierung der Probelösung Enzymtest-Messpipette bzw. Pipettenspitze der Kolbenhubpipette mit der Probelösung vorspülen.

** Z. B. mit Rührspatel oder durch Umschwenken nach Verschliessen z. B. mit Parafilm (Warenzeichen der American Can Company, Greenwich, Ct., USA)

1 Hepes = 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
 2 Das Absorptionsmaximum von NADH liegt bei 340 nm. Bei Verwendung von Spektralphotometern wird im Absorptionsmaximum, bei Verwendung von Spektral-Linienspektrometern mit Hg-Dampflampe wird bei einer Messstrahlung von 365 nm oder 334 nm gemessen.
 3 Anstelle von Glasküvetten sind ggf. auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.
 4 S. Hinweise zur Testdurchführung

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

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

Die gemessene Extinktionsdifferenz sollte zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Extinktionseinheiten betragen (s. "Hinweise zur Testdurchführung" und "Empfindlichkeit und Nachweisgrenze", Pkt. 4).

Berechnung

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

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

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

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

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient von NADH bei:
 340 nm = 6,3 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]
 Hg 365 nm = 3,4 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]
 Hg 334 nm = 6,18 [l × mmol⁻¹ × cm⁻¹]

Hieraus ergibt sich für D-Äpfelsäure:

$$c = \frac{2,950 \times 134,09}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E = \frac{3,956}{\epsilon} \times \Delta E \text{ [g D-Äpfelsäure/l Probelösung]}$$

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

Bei der Analyse fester oder halbfester Proben, die für die Vorbereitung der Probe eingewägt werden, wird das Analysenergebnis auf die Einwaage bezogen:

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

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Menge an D-Äpfelsäure zwischen 2 µg und 50 µg (Messung bei 365 nm) bzw. 1 µg und 30 µg (Messung bei 340, 334 nm) betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit zu verdünnen, dass die D-Äpfelsäurekonzentration zwischen 0,1 und 0,5 g/l bzw. 0,06 und 0,3 g/l liegt.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge an D-Äpfelsäure im Liter Messung bei		Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor F
340 oder 334 nm	365 nm		
< 0,3 g	< 0,5 g	-	1
0,3-3,0 g	0,5-5,0 g	1 + 9	10
3,0-30 g	5,0-50 g	1 + 99	100
> 30 g	> 50 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 1,800 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 zu berücksichtigen.



2. Technische Hinweise

- 2.1 Bei der Bestimmung von D-Äpfelsäure im unteren Messbereich (Spuren-Analytik) ist besonders darauf zu achten, dass die zur Vorbereitung der Probe notwendigen Hilfsmittel frei von D-Äpfelsäure sind.
- 2.2 Bei der Berechnung ist eindeutig anzugeben, ob die Ergebnisse als D-Äpfelsäure (Molmasse 134,09 g/Mol) oder als D-Malat (Molmasse 132,07 g/Mol) angegeben werden. (Bei der enzymatischen Bestimmung wird das D-Malat-Ion gemessen.)

3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

D-Äpfelsäure reagiert rasch. Eine Nebenaktivität des Enzyms setzt auch L-Weinsäure, wenn auch mit erheblich geringerer Geschwindigkeit, um. Hieraus ergibt sich bei etwa gleichen Konzentrationen von L-Weinsäure und D-Äpfelsäure im Test eine leichte "Schleichreaktion", die jedoch durch rechnerische Extrapolation berücksichtigt werden kann. Bei hohem Überschuss an L-Weinsäure ist wie in den Beispielen zur Bestimmung von D-Äpfelsäure in Wein und Traubensaft angegeben zu verfahren.

Bei der Analyse der Reinsubstanz D-Äpfelsäure ist darauf zu achten, dass Präparate des Handels ca. 1-4 % L-Äpfelsäure enthalten können (Lit. 1).

4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze (Lit. 1)

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen $v = 1,800$ ml und Messung bei 340 nm einer D-Äpfelsäure-Konzentration von 0,2 mg/l Probeflösung (bei $v = 0,100$ ml entsprechend 3 mg/l Probeflösung).

Die Nachweisgrenze von 0,35 mg/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,010 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probevolumen $v = 1,800$ ml.

5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von ca. 1 µg D-Äpfelsäure/Ansatz (0,35 mg D-Äpfelsäure/l Probeflösung; Probevolumen $v = 1,800$ ml) und 50 µg D-Äpfelsäure/Ansatz (0,5 g D-Äpfelsäure/l Probeflösung; Probevolumen $v = 0,100$ ml).

6. Präzision

Bei einer Doppelbestimmung, ausgehend von einer Probeflösung, ist mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,005 bis 0,010 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probevolumen $v = 0,100$ ml und Messung bei 340 nm einer D-Äpfelsäure-Konzentration von 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:

$x = 31,3 \mu\text{M}$	Probeflösung	$\Delta E_{339 \text{ nm}} = 0,199$	VK = 1,01 %	$n = 10$
$x = 61,7 \mu\text{M}$	Probeflösung	$\Delta E_{339 \text{ nm}} = 0,387$	VK = 0,83 %	$n = 10$
$x = 125,4 \mu\text{M}$	Probeflösung	$\Delta E_{339 \text{ nm}} = 0,791$	VK = 0,79 %	$n = 10$

(Lit. 1)

Wein:

$$\begin{aligned} r &\sim 5\%, \text{ entsprechend } r = 0,05 \times x_i \\ R &\sim 10\%, \text{ entsprechend } R = 0,10 \times x_i \\ x_i &= \text{Gehalt an D-Äpfelsäure in g/l} \end{aligned} \quad (\text{Lit. 2.1})$$

$$\begin{aligned} r &= 0,05 \times x_i \\ R &= 0,1 \times x_i \\ \bar{x}_i &= \text{Gehalt an D-Äpfelsäure in g/l} \end{aligned} \quad (\text{Lit. 2.2})$$

7. Störungen

In der Probe enthaltene Gerbstoffe können zu einer leichten Hemmung des Testes führen: die Anwesenheit von 50 µg Pyrogallol/Ansatz verzögert die D-Äpfelsäure-Umsetzung um etwa 5 min.

Pflanzliche Farbstoffe in der Probe können eine Schleichreaktion auslösen. Ggf. ist ein Probe-Leerwert anzusetzen: Der Testansatz enthält alle Inhaltsstoffe mit Ausnahme des Start-Enzyms; die Extinktionsmessungen von Reagenzien-Leerwert, von Probe und Probe-Leerwert erfolgen zu gleichen Zeiten. Die Extinktionsdifferenz $\Delta E_{D\text{-Äpfelsäure}}$ berechnet sich aus:

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

Auch 2-Oxoglutarat führt mit einer Konzentration von 100 µg/Ansatz zu einer Schleichreaktion von etwa 0,5 mE/min.

Blei-Ionen üben mit 0,1 mg/Ansatz eine Hemmwirkung auf den Test aus, die unter Reaktionsbedingungen nach 20 min etwa 85% D-Äpfelsäure wiederfinden lässt.

8. Erkennen von Störungen des Tests

- 8.1 Ist die Umsetzung von D-Äpfelsäure 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 D-Äpfelsäure (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 Probeflösung 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 Extinktionsdifferenz 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 D-Äpfelsäure 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 1,800 ml zum Test einsetzen;

trübe Lösungen filtrieren;

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

saure Proben durch Zugabe von Natronlauge oder Kalilauge auf ca. pH 8-9 einstellen;

saure und schwach gefärbte Proben mit Natronlauge oder Kalilauge auf pH 8-9 einstellen und ca. 30 min stehen lassen;

"stärker gefärbte" Proben (ggf. auf pH 8-9 eingestellt) gegen Probe-leerwert (= Puffer bzw. bidest. Wasser + Probe) messen (Photometer mit Probeleerwert im Strahlengang auf 0,000 stellen);

stark gefärbte Proben, die unverdünnt oder mit einem höheren Probevolumen zum Test eingesetzt werden, mit Aktivkohle (z.B. 6 g/100 ml) oder mit Polyvinylpyrrolidon, PVPP (z.B. 8-20 g/100 ml) behandeln;

feste und halbfeste Proben zerkleinern oder homogenisieren, mit Wasser extrahieren bzw. lösen, wenn nötig filtrieren.

11. Anwendungsbeispiele

Bestimmung von D-Äpfelsäure in Fruchtsäften (Lit. 3.1)

- a) Farbbarme, bzw. wenig gefärbte Säfte (Citrusfrüchte, Birne, Ananas, Aprikose, Apfel):
25 ml Fruchtsaft mit KOH (2 M) auf einen pH von 7-8 einstellen und mit bidest. Wasser auf 50 ml auffüllen. 3 g Aktivkohle zugeben (oder 4 g PVPP), mischen, 2 min rühren und filtrieren. 1,000 bis 1,800 ml Filtrat zum Test einsetzen.
- b) Farbtintensive Säfte (Kirsche, Johannisbeere, schwarz und rot):
25 ml Fruchtsaft mit KOH (2 M) auf einen pH von 7-8 einstellen und mit bidest. Wasser auf 50 ml auffüllen. 3 g Aktivkohle zugeben (oder 4 g PVPP), mischen, 2 min rühren und filtrieren. 0,100 bis 0,200 ml Filtrat zum Test einsetzen.
- c) Weisses Traubensaft:
50 ml Saft mit 250 mg festem Calciumhydroxid und 10 ml Ethanol (ca. 98%) versetzen und 2 min rühren. pH mit HCl (2 M) auf 7-8 einstellen. Mischung quantitativ in einen 100 ml-Messkolben überführen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren. 0,500 bis 1,500 ml Filtrat zum Test einsetzen.

d) Roter Traubensaft:

50 ml Saft mit 250 mg festem Calciumhydroxid und 10 ml Ethanol (ca. 98 %) versetzen und 2 min rühren. pH mit HCl (2 M) auf 7-8 einstellen. Mischung quantitativ in einen 100 ml-Messkolben überführen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren. 3 g Aktivkohle zugeben, mischen, 2 min rühren und erneut filtrieren. 0,100 bis 0,200 ml Filtrat zum Test einsetzen.

Bestimmung von D-Äpfelsäure in Wein (nach Beutler, Lit. 1.)

25 ml Wein mit 125 mg Calciumhydroxid und 5 ml Ethanol (ca. 98 %) versetzen, 2 min rühren und ggf. mit Kalilauge (1 M) auf pH 7-8 einstellen, mit bidest. Wasser quantitativ in einen 50 ml-Messkolben überführen, bis zur Marke auffüllen und mischen. Danach durch ein Faltenfilter filtrieren und klares, farbloses oder leicht gefärbtes Filtrat mit einem Volumen von v = 1,000-1,800 ml zum Test einsetzen.

Stark gefärbte Filtrate und ggf. Filtrate, die eine Schleichreaktion zeigen, müssen entfärbt werden. In diesem Fall wie folgt verfahren:

10 ml Filtrat mit 2 g feuchtem PVPP versetzen, 2 min rühren, durch ein Faltenfilter filtrieren und dieses Filtrat mit einem Volumen von v = 1,000-1,800 ml zum Test einsetzen.

Bei Weinen wird häufig beobachtet, dass die Reaktion nach 20 min nicht zum Stillstand kommt. In diesem Fall sind die Extinktionen weiter in 2 min Abständen zu messen, bis eine konstante Extinktionszunahme pro 2 min erreicht ist.

Wurden bei E₂ konstante Extinktionszunahmen festgestellt, so werden die Extinktionen auf die Zeit der Zugabe von Lösung 3 (D-MDH, decarb.) extrapoliert.

Bestimmung von D-Äpfelsäure in Wein und Traubensaft (nach Hunger et al., Lit. 3.2)

2,5 g (festes) Kaliumchlorid in einen 50 ml-Messkolben einwiegen, 25 ml Wein bzw. Traubensaft in den Messkolben pipettieren und bis zum vollständigen Lösen von Kaliumchlorid mit Magnetrührer rühren oder Messkolben kräftig schütteln. Anschliessend 0,5 ml Eisessig zugeben, mischen und Messkolben mit Ethanol (96 %; v/v) portionsweise bis zur Marke auffüllen. Mischen und Messkolben über Nacht in Kühlschrank stellen.

Lösung filtrieren und 20 ml Filtrat mit KOH auf pH 9 einstellen (zuerst mit 2 M KOH auf pH 8 und dann mit 0,2 M KOH auf pH 9), in 25 ml-Messkolben überführen und mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen. Zur Entfärbung 0,5 g Aktivkohle hinzufügen, mischen und durch 0,2 µm-Feinfilter filtrieren. Filtrat zum Test einsetzen. (Die Zugabe von Aktivkohle ist auch bei der Analytik von Weisswein empfehlenswert.)

Hinweis:

Proben, die keine L-Weinsäure enthalten, werden wie folgt vorbereitet: 20 ml Probe mit KOH auf pH 9 einstellen, in 25 ml-Messkolben überführen und mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen. Zur Entfärbung 0,5 g Aktivkohle hinzufügen, mischen und durch 0,2 µm-Feinfilter filtrieren. Filtrat zum Test einsetzen.

D-Äpfelsäure-Testkontroll-Lösung (Flasche 4)

Konzentration: siehe Flaschenetikett

D-Äpfelsäure-Testkontroll-Lösung ist eine stabilisierte wässrige Lösung von D-Äpfelsäure. Sie dient als Testkontroll-Lösung für die enzymatische Bestimmung von D-Äpfelsäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien.

Anwendung:

1. Zusatz der D-Äpfel-Testkontroll-Lösung zum Testansatz:

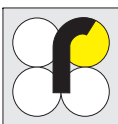
Die Testkontroll-Lösung wird anstelle der Probelösung zur Bestimmung eingesetzt.

2. "Quantitativer Nachstart":

Nach Ablauf der Reaktion mit Probelösung und Messung von E₂ werden 0,050 ml der Testkontroll-Lösung zum Probeansatz gegeben. Nach Ablauf der Reaktion (ca. 20 min) wird die Extinktion E₃ gemessen. Aus der Differenz (E₃-E₂) 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 der Angabe des Flaschenetiketts ab.

Ebenfalls verfügbar:

Test-Combination L-Äpfelsäure, Best. Nr. 10 139 068 035



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

Bestimmung von D-Äpfelsäure in Äpfeln

Äpfel zerkleinern und homogenisieren. Ca. 40 g Probenmaterial in ein 100 ml-Becherglas genau einwiegen und ca. 20 ml kochendes bidest. Wasser hinzufügen. 10 min beim Sieden halten und danach auf 20-25°C abkühlen lassen. Mit Kalilauge (1 M) pH 7-8 einstellen. Den Inhalt des Becherglases quantitativ mit bidest. Wasser in einen 100 ml-Messkolben überführen und bis zur Marke auffüllen, mischen und durch ein Faltenfilter filtrieren. Danach 10 ml Filtrat mit 0,6 g Aktivkohle versetzen, 2 min rühren, durch ein Faltenfilter filtrieren und das klare Filtrat mit einem Volumen von v = 0,500 ml zum Test einsetzen.

12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch in der Forschung bei der Analytik von biologischen Proben anwendbar.

Angaben zu Probenahme, Behandlung und Stabilität der Probe siehe Gutmann, I., und Wahlefeld, A.W. (1974) in: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1633-1634, Verlag Chemie, Weinheim

Literatur

1. Beutler, H.-O. & Wurst, B. (1990) A New Method for the Enzymatic Determination of D-Malic Acid in Foodstuffs, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **86**, 341-344 und 386-389
2.1 Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, Complément n° 1 à l'édition officielle de juin 1990, OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, Annexe A, S. 1-3
2.2 Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 272 (3. Oktober 1990) Rechtsvorschriften: Verordnung (EWG) Nr. 2676/90 der Kommission vom 17. September 1990 zur Festlegung gemeinsamer Analysemethoden für den Weissektor (S. 106-108) Official Journal of the European Communities L 272 (3 October 1990), Commission Regulation (EEC) No 2676/90 of 17 September 1990 determining Community methods for the analysis of wines (pp. 106-108) ; L 99 (14. April 1999) Verordnung (EG) Nr. 761/1999 der Kommission vom 12. April 1999 zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 2676/90 zur Festlegung gemeinsamer Analysemethoden für den Weissektor
2.3 Europäische Norm/European Standard EN 12138 (Dez. 1997) Frucht- und Gemüsesäfte: Enzymatische Bestimmung des Gehaltes an D-Äpfelsäure - Spektralphotometrische Bestimmung von NAD (Fruit and vegetable juices - Enzymatic determination of D-malic acid content - NAD spectrometric method)
2.4 Deutsche Norm DIN EN 12138 (1997) Frucht- und Gemüsesäfte, Teil 13: Enzymatische Bestimmung des Gehaltes an D-Äpfelsäure; Spektralphotometrische Bestimmung von NAD
2.5 Methodensammlung der Internationalen Fruchtsaft-Union (IFU-Analysenmethode Nr. 64-1995); enthalten in "Code of Practice for Evaluation of Fruit and Vegetable Juices" (1996) edited by Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Economic Community (A.I.J.N.)
3.1 Beutler, H.-O. & Ara, V. (1992) Enzymatische Bestimmung von D-Äpfelsäure in Fruchtsäften, Flüssiges Obst **59**, 552-554; Enzymatic Determination of D-Malic Acid in Fruit Juices, Fruit Processing **2**, 140-141
3.2 Hunger, Ch., Schuch, R. & Hörtnner, H., Bundesanstalt für Lebensmitteluntersuchung und -forschung, Wien (1995) Enzymatic Determination of D-Malic Acid in Wine and Fruit Juices, in Current Status and Future Trends in Analytical Food Chemistry, Proceedings of the Eight European Conference on Food Chemistry (EURO FOOD CHEM VIII), Vol. 3, 715-718

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
Lösung 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Lösung 2	0,100 ml	0,100 ml	0,100 ml	0,100 ml
Probelösung	-	0,100 ml	-	0,050 ml
Testkontroll-Lsg.	-	-	0,100 ml	0,050 ml
bidest. Wasser	1,800 ml	1,700 ml	1,700 ml	1,700 ml

mischen, nach ca. 6 min Extinktionen der Lösungen messen (E₁). 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:

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

