CH – 12.20.

Stanovenie množstva kyseliny L-mliečnej, jantárovej a D-3-hydroximaslovej vo vajciach a vo vaječných výrobkoch.

Enzymatická metóda

1. Oblasť použitia

Táto metóda popisuje enzymatický postup na stanovenie obsahu kyseliny L- mliečnej, jantárovej a D-3-hydroximaslovej vo vajciach a vo vaječných výrobkoch. Metóda je použiteľná pre koncentrácie nad 25 mg L-mliečnej kyseliny/kg vaječnej sušiny, popr. 10 mg jantárovej kyseliny/kg vaječnej sušiny, popr. nad 5 mg D-3-hydroximaslovej/kg vaječnej sušiny.

2. Pojem

Pod obsahom kyseliny L-mliečnej, jantárovej a D-3-hydroximaslovej vo výrobkoch uvedených v bode 1 sa podľa tohto popísaného postupu rozumie obsah kyseliny L-mliečnej, jantárovej a D-3-hydroxymaslovej. Udáva sa v mg/kg sušiny.

3. Princíp metódy

Vzorka sa riedi vodou popr. sa rozpustí, roztok sa zohreje a následne sa ošetrí reagenčným Carrezovým činidlom (ferrokyanid draselný (II), síran zinočnatý) na oddelenie proteínov. Po filtrácii sa použije číry roztok vzorky na enzymatické stanovenie organických kyselín.

V rôznych fotometrických kyvetách prebiehajú nasledovné reakcie (skrátené, pozri časť 10):

3.1 Stanovenie kyseliny L – mliečnej

3.1.1 L – mliečna kyselina (L-laktát) + $NAD^+ \xrightarrow{LDH}$ pyruvát + NADH + H^+

Rovnováha tejto reakcie je silne posunutá na stranu laktátu. Odčerpávaním pyruvátu pomocou reakcie 3.1.2

3.1.2 pyruvát + L-glutamát $\xrightarrow{GPT}$ L-Alanin + 2-Oxoglutarát

dochádza k posunu rovnováhy, takže sa tvorí NADH, ktorý sa využíva na meranie prírastku extinkcie a na ktorého obsah sa vzťahuje výpočet obsahu kyseliny L-mliečnej (L-laktát).

3.2 Stanovenie kyseliny jantárovej

3.2.1 kyselina jantárová (sukcinát) + ITP + CoA $\xrightarrow{SCS}$ IDP + sukcinyl-CoA + fosfát

V reakcii (1) vytvorený IDP fosforyluje v prítomnosti PEP cez PK podľa reakcie (2), pričom vzniká pyruvát:

3.2.2 IDP + PEP $\xrightarrow{PK}$ ITP + pyruvát

Pyruvát sa redukuje v prítomnosti NADH cez LDH na laktát podľa reakcie (3)

3.2.3 pyruvát + NADH + H^+ $\xrightarrow{LDH}$ L-laktát + NAD^+

Spotreba NADH - meranie extinkčného úbytku sa vzťahuje na výpočet obsahu kyseliny jantárovej (sukcinát).

3.3 Stanovenie kyseliny D-3-hydroximaslovej

3.3.1 Kyselina D-3-hydroximaslová (D-3-hydroxybutarát) + NAD^+ $\xrightarrow{3\text{-}HBDH}$ acetoacetát + NADH + H^+

Rovnováha tejto reakcie je silne posunutá na stranu D-3- hydroxybutarátu. Záchytom NADH pomocou reakcie (2)

3.3.2 NADH + INT + H^+ $\xrightarrow{Diaforaza}$ NAD^+ + INT-formazán

nastáva porušenie rovnováhy, pričom nevratne vzniká formazán merateľný vo viditeľnej oblasti pri 492 nm. Množstvo INT formazánu je úmerné množstvu kyseliny D-3-hydroximaslovej.

4. Chemikálie

Pokiaľ nie je inak uvedené,
- sa majú používať chemikálie PA,
- pod „roztokom“ sa rozumie vodný roztok.

Voda musí byť čerstvá, redestilovaná, alebo zodpovedajúcej čistoty.

4.1 Carrezovo činidlo I.

Roztok ferrokyanidu draselného
e(K_4 [$Fe(CN)_6$] . 3 H_2O = 150 g/l [1])

4.2 Carrezovo činidlo II

Roztok síranu zinočnatého
e$ZnSO_4$. 7 H_2O = 300 g/l

4.3 Roztok hydroxidu sodného, c=1,0 mol/l [1])

4.4 Roztok hydroxidu sodného, c=5,0 mol/l[1])

4.5 Glycilglycín – pufrovací roztok, pH = 10

2,375 g glycilglycínu a 0,44 g L-kyseliny glutamínovej sa rozpustí v 25 ml vody s asi 2,5-3 ml hydroxidu sodného (c = 5,0 mol/l). Nastaví sa pH 10 a doplní sa vodou na 30 ml. *c(NaOH) = 5,0 mol/l*

Roztok je stabilný pri 4 ^{o}C najmenej 3 mesiace.

4.6 Roztok koenzýmu (NAD)

210 mg nikotinamid-adenin-dinukleotid (beta-NAD. H_2O, lyofilizovaná voľná kyselina, w >98 % [1]) sa rozpustí v 6 ml vody.

Roztok je stabilný pri 4 ^{o}C najmenej 3 týždne.

4.7 Suspezia enzýmu (GPT)

Glutamát-pyruvát-transamináza z bravčového srdca (EC 2.6.1.2) v roztoku síranu amónneho (c = 3,2 mol/l), 160 U/ml [2]). *$c[(NH_4)_2SO_4] = 3,2$ mol/l*
Suspezia je stabilná pri 4 ^{o}C najmenej 1 rok

4.8 Roztok enzýmu (L-LDH)

L-Laktát dehydrogenáza z bravčového mäsa (EC 1.1.1.27) v zmesi glycerínu a vody (w glycerín = 50 %), 5500 U/ml.

Roztok je stabilný pri 4 ^{o}C najmenej 1 rok.

4.9 Glycylglycín – pufrovací roztok, pH = 8,4

2,40 g glycylglycinu a 0,60 g síranu horečnatého ($MgSO_4$. 7 H_2O) sa rozpustí v 50 ml vody, pH sa upraví s asi 2 ml roztoku hydroxidu sodného (c = 5,0 mol/l) na pH 8,4 a doplní sa vodou na 60 ml. *c(NaOH) = 5,0 mol/l*

Roztok je stabilný pri 4 ^{o}C najmenej 4 týždne.

---

[1]) w = hmotnostný zlomok
c = mólová koncentrácia
e = hmotnostná koncentrácia

[2]) 1 medzinárodná jednotka (1 U) udáva množstvo enzýmu (aktivitu), ktorá za štandartných podmienok (okrem iného pri teplote 25 ^{o}C) katalyzuje konverziu 1 μmol substrátu za min.

4.10 Roztok koenzýmu (NADH)

45 mg redukovaného β - nikotinamid-adenin-dinukleotidu vo forme dvojsodnej soli (β-NADH - Na_2) a 60 mg hydrogénuhličitanu sodného ($NaHCO_3$) sa rozpustí 6 ml vody.
Roztok je stabilný pri 4 ^oC najmenej 4 týždne.

4.11 Roztok koenzýmu (CoA/ITP/PEP)

60 mg koenzýmu A (lyofilizovaná soľ trilitia, w = 85 % CoA celkove), 80 mg inozintrifosfátu (dvojsodná soľ, w > 87 % ITP-Na_2) a 60 mg fosfoenylpyruátu (kryštalická tricyclohexylamónna soľ, w = 98 % PEP $(CHA)_3$) sa rozpustí v 6 ml vody .

Roztok je stabilný pri 4 ^oC najmenej 2 týždne.

4.12 Suspenzia enzýmu (PK/LDH)

Asi 600 U pyruvát-kinázy z králičieho mäsa a asi 550 U L-laktát-dehydrogenázy z králičieho mäsa sa doplní roztokom síranu amónneho (c = 3,2 mol/l) na 1,0 ml. *$c[(NH_4)_2SO_4] = 3,2$ mol/l*

Suspenzia je stabilná pri 4 ^oC najmenej 1 rok.

4.13 Suspenzia enzýmu (SCS)

Sukcinyl-CoA-syntetáza z bravčového srdca v roztoku síranu amónneho (c = 3,2 mol/l), 50 U/ml. *$c[(NH_4)_2SO_4] = 3,2$ mol/l*

Suspenzia je stabilná pri 4 ^oC najmenej 1 rok.

4.14 Fosfátový pufrovací roztok

3,58 g hydrogénfosforečnanu dvojdraselného (K_2HPO_4) a 29,2 mg dihydrogén-fosforečnanu draselného (KH_2PO_4) sa rozpustí vo vode a doplní do 100 ml.

4. 15 Triethanolamín - pufrovací roztok, pH = 8,6

1,55 g triethanolamínhydrochloridu a 1,5 mg síranu zinočnatého($ZnSO_4 . 7 H_2O$) s asi 1,5 ml roztoku hydroxidu sodného (c = 5,0 mol/l) sa upraví pH na 8,6, pridá sa 0,5 ml triton x-100 s 5,0 ml fosfátového pufru (4.14) a doplní sa vodou do 25 ml.

Roztok je stabilný pri 20 ^oC najmenej 2 mesiace.

4. 16 Enzýmový roztok (NAD/diaforáza)

6 mg diaforázy-lyofilizátu (EC 1.6.4.3) z bravčového srdca s 2 mg enzýmového proteínu,10 U/mg enzýmový proteín, a 40 mg nicotinamidu-adeninu-dinucleotidu (beta-NAD.H_2O, lyofilizovaná voľná kyselina, w > 98 %) sa rozpustí v 8 ml vody.
Roztok je stabilný pri 4 ^oC najmenej 4 týždne.

4.17 Roztok jódnitrotetrazoliumchloridu (INT roztok)

8 mg –(-jódfenyl)–3-(-4-nitrofenyl)–5-fenyl- 2H-tetrazoliumchlorid (jódnitrotetrazoliumchlorid) sa rozpustí v 8 ml vody.

Roztok je stabilný pri 20 ^oC najmenej 1 mesiac.

4.18 Suspenzia enzýmu (3-HBDH)

3-hydroxybutarát-dehydrogenáza z Rhodopseudomonas spheroides (EC 1.1.1.30) v roztoku síranu amónneho (ammoniumsulfat) (c = 3,2 mol/l), 15 U/ml.
Suspenzia je stabilná pri 4 ^oC najmenej 1 rok.

4.19 n-oktalol

Poznámka: Sú dostupné hotové reagenčné prípravky. Pri ich používaní sa postupuje podľa pracovného návodu výrobcu.

5. Prístroje a pomôcky

5.1 Magnetická miešačka
5.2 Vodný kúpeľ, s možnosťou nastavenia teploty na 95-100 ^oC
5.3 Odmerné pipety, trieda AS, adjustované podľa DIN 12 699
0,02 ml, 0,05 ml, 0,10 ml, 0,20 ml, 1 ml, 2 ml, 10 ml
5.4 Sklené alebo umelohmotné kyvety, hrúbky 1 cm
5.5 Erlenmayerove banky so zábrusom, pevne uzatvárateľné, 100 ml
5.6 Spektrofotometer, vhodný pre merania pri 340 a 492 nm, so spektrálnou šírkou najviac ± 5 nm.

Poznámka: Môžu sa používať aj filtračné spektrofotometre s ortuťovými lampami, ktoré umožňujú meranie pri 365 popr. 334 a 492 nm.

6. Odber vzoriek

Odber vzoriek nie je súčasťou metódy špecifikovanej v tomto metodickom pokyne. Ak neexistuje špecifická medzinárodná norma na odber vzoriek skúšaného výrobku, odporúča sa, aby sa zúčastnené strany na tomto postupe dohodli.

7. Postup

7.1 Príprava vzorky

Vzorka sa po vybratí z chladničky nechá zabalená stáť pri laboratórnej teplote asi pol hodiny. Potom sa dá celý vzorkovací materiál vo vzorkovacom množstve do primeranej nádoby a sklenenou tyčinkou sa premieša.

7.2 Stanovenie

7.2.1 Príprava roztoku vzorky

Vzorka pripravená podľa 7.1 sa odváži v 100 ml v Erlenmayerovej banke so zábrusom (5.5) na dve desatinné miesta. Stanoví sa hmotnosť tara uzavretej banky so zábrusom, vrátane sklenenej tyčinky.
Platia nasledovné navážky:
asi 20 g pre tekuté vajcia,
asi 5 g pre sušené vajcia.

Pri ostatných výrobkoch (napr. slané alebo sladké miešané vaječné výrobky) je potrebné stanoviť optimálnu navážku v predpokusoch.

Ku vzorke sa pridá asi 60 ml vody a 1 kvapka n-oktanolu. Mieša sa (magnetická miešačka), až je zmes rovnomerne rozmiešaná. Nádoba sa potom uzavrie a zohrieva sa 20 minút vo vodnom kúpeli pri teplote 95-100 ^{o}C. Nádoba sa vyberie z kúpeľa. Do ešte horúceho roztoku sa opatrne za stáleho miešania (magnetická miešačka) pridá 6,0 ml roztoku Carrez I.
Zmes sa intenzívne trepe 5-10 s., potom sa pridá opatrne za stáleho miešania (magnetická miešačka) pipetou 6,0 ml roztoku Carrez II.
Zmes sa trepe asi 5-10 s. Potom sa k nej pridá 6-10 ml roztoku hydroxidu sodného (c=1,0 mol/l) na úpravu pH od 7,5 do 8,5 (nie vyššie!) (meria sa elektródou alebo papierikom) a opäť sa trepe.
Obsah banky sa doplní vodou na 100,0 g (nie ml), trepe sa a filtruje, pričom sa prvé ml filtrátu odstránia. Ak nie je filtrát dostatočne číry, môže sa roztok centrifugovať (zrýchlenie: asi 1000 g = asi 10 000 m.sec^{-2} .
Filtrát popr. Centrifugát sa dá do Erlenmayerovej banky so zábrusom a zátkou (roztok vzorky = V_1).
Objem roztoku vzorky má byť 100,0 ml . Objemová chyba (hustota roztoku, pevné časti tuku, proteín a sediment) sa neberie do úvahy.

7.2.2 Merací roztok a meranie enzymatickej reakcie

Na pipetovanie činidiel a roztokov vzoriek do kyviet sa nesmú používať objemové pipety. Roztoky enzýmov, koenzýmov a pufrov sa môžu pipetovať aj s dávkovacími pipetami. Pre dávkovanie roztoku vzorky sa musí zásadne používať odmerná pipeta pre enzymatický test (5.3). Absorbčné maximum NADH (pri meraní L- mliečnej a jantárovej kyseliny) leží pri 340 nm. Pri použití spektrálneho fotometra sa meria iba v absorbčnom maxime. Pri použití spektrofotometra s ortuťovou lampou sa meria pri vlnovej dĺžke 334 nm.
Absorbčné maximum INT formazánu (pri meraní D-3 kyseliny maslovej) leží pri 492 nm. Meranie preto prebieha pri tejto vlnovej dĺžke a pri použití spektrálneho fotometru popr. pri filtre 492 nm pri použití spektrofotometra s ortuťovou lampou.

7.2.2.1 Meranie enzymatickej reakcie, stanovenie L-mliečnej kyseliny

Stanovenie sa vykonáva pri teplote asi 20 ^{o}C.

Poznámka: Používané prístroje (sklo, pipety, kyvety) musia byť bez stôp obsahu kyseliny mliečnej. Špičky pipiet sa nesmú chytať rukami (pot na rukách obsahuje kyselinu mliečnu).

pipetovanie do kyviet	slepý pokus	meraný roztok
roztok pufru (4.5) roztok koenzýmu (NAD) (4.6) suspenzia enzýmu (GPT) (4.7) voda roztok vzorky (7.2.1)	1,00 ml 0,20 ml 0,02 ml 1,00 ml -	1,00 ml 0,20 ml 0,02 ml 0,90 ml 0,10 ml
po uzavretí sa opatrne ale dôkladne premieša a po asi 5-tich minútach sa zmeria extinkcia roztokov slepého pokusu aj vzorky okamžite tesne za sebou oproti vzduchu (žiadna kyveta v prúde lúčov) (E_1), potom sa pridá		
roztok enzýmov (L-LDH) (4.8)	0,02 ml	0,02 ml
Zmieša sa opatrne ale dôkladne, po skončení reakcií (asi 20 minút) sa merajú extinkcie roztokov okamžite po sebe proti vzduchu (E_2). Ukončenie reakcie sa kontroluje opakovaným meraním po niekoľkých minútach. Ak sa reakcia neukončila po 20 min, ďalej sa merajú extinkcie po 5 min, až sa dosiahne konštantný pokles extinkcie po 5 min. Ak sa zistia konštantné poklesy extinkcií, extrapoluje sa extinkcia E_2 na čas pridania roztoku enzýmov (4.8)		

Poznámka:

- rast extinkcie ($E_2 - E_1$) meracieho roztoku by mal ležať medzi 0,05-0,5. Ak je extinkčný rozdiel príliš nízky, môže sa zvýšiť objem roztoku vzorky, ktorá sa pipetuje do kyvety (až do 1,00 ml) V tomto prípade treba znížiť objem doplňovanej vody, aby bol v kyvete pre merací roztok a slepý pokus rovnaký spoločný objem. Ak je extinkčný rozdiel príliš vysoký, musí sa roztok vzorky zriediť alebo dávkovať do kyvety v objeme od 0,05 ml. (Aj v tomto prípade objemy vyrovnať s vodou, 0,95 ml). Pri výpočte brať do úvahy zmenené objemy vzoriek.
- pri sériových analýzach je pre sériu potrebný iba jeden slepý pokus

7.2.2.2 Meranie enzymatickej reakcie, stanovenie kyseliny jantárovej

Stanovenie sa vykonáva pri teplote 37 ^{o}C.

pipetovanie do kyviet	Slepý pokus	meraný roztok
roztok pufru (4.9)	1,00 ml	1,00 ml
roztok koenzýmu (NADH) (4.10)	0,10 ml	0,10 ml
roztok koenzýmu (CoA/ITP/PEP) (4.11)	0,10 ml	0,10 ml
suspenzia enzýmu (PK/LDH)(4.12)	0,05 ml	0,05 ml
voda	2,00 ml	1,00 ml
roztok vzorky (7.2.1)	-	1,00 ml
opatrne ale dôkladne sa zmieša a nechá stáť pri **37 ^{o}C**. **P**o asi 5 minútach sa zmeria extinkcia roztokov slepého pokusu aj vzorky okamžite tesne za sebou oproti vzduchu (žiadna kyveta v prúde lúčov) (E1), potom sa pridá		
roztok enzýmov (SCS) (4.13)	0,02 ml	0,02 ml
opatrne ale dôkladne sa roztok v kyvetách premieša a nechá stáť pri **37 ^{o}C 30 minút** Potom sa zmeria extinkcia roztokov okamžite po sebe oproti vzduchu (E_2). Ukončenie reakcie sa kontroluje opakovaným meraním po 10 min., po príp. po 20 min. Ak sa meria konštantný nárast extinkcie, potom sa extikcie E_2 extrapolujú na čas pridania enzýmovej suspenzie (4.13).		

Poznámka:

- Pokles extinkcie ($E_1 - E_2$) meracieho roztoku má byť nad 0,03. Ak je rozdiel extinkcií príliš nízky, môže sa zvýšiť objem roztoku vzorky, ktorá sa pipetuje do kyvety (až do 2,00 ml) V tomto prípade treba znížiť objem doplňovanej vody, aby bol v kyvete pre merací roztok a slepý pokus rovnaký spoločný objem.
- pri sériových analýzach je iba jeden slepý pokus potrebný pre sériu

7.2.2.3 Meranie enzymatickej reakcie

Stanovenie D-3-hydroximaslovej kyseliny

Stanovenie sa vykonáva pri teplote asi 20 ^{o}C.

pipetovanie do kyviet	Slepý pokus	meraný roztok
roztok pufru (4.15)	0,60 ml	0,60 ml
roztok enzýmu (NAD/diaforáza) (4.16)	0,20 ml	0,20 ml
roztok INT (4.17)	0,20 ml	0,20 ml
voda	2,00 ml	1,00 ml
roztok vzorky (7.2.1)	-	1,00 ml
opatrne ale dôkladne sa zmieša a po 2 minútach sa zmeria extinkcia roztokov slepého pokusu aj vzorky okamžite tesne za sebou oproti vzduchu (žiadna kyveta v prúde lúčov) (E1), potom sa pridá		
roztok enzýmov (3-HBDH) (4.18)	0,05 ml	0,05 ml
opatrne ale dôkladne sa zmieša a presne po 20 minútach sa zmeria extinkcia roztokov slepého pokusu aj vzorky okamžite tesne za sebou oproti vzduchu (žiadna kyveta v prúde lúčov) (E2), Presne po ďalších 10 min sa meranie opakuje(E_3).		

Poznámka:

- INT je citlivé na svetlo a má byť počas testu uchovávané v tme. Aj kyvety treba počas testovania chrániť pred účinkom svetla.
- Nárast extikcie ($E_2 - E_1$) meraného roztoku má byť medzi 0,05 – 0,5. Ak je extikčný rozdiel príliš nízky, môže sa zvýšiť objem roztoku vzorky, ktorá sa pipetuje do kyvety (až do 2,00 ml) V tomto prípade treba znížiť objem doplňovanej vody, aby bol v kyvete pre meraný roztok a slwpý pokus rovnaký spoločný objem.
- Ak je extinkčný rozdiel príliš vysoký, musí sa roztok vzorky zriediť alebo dávkovať do kyvety v objeme od 0,50 ml (0,20 ml). Aj v tomto prípade vyrovnať s vodou, asi 1,5 popr.1,8 ml. Pri výpočte brať zreteľ na zmenené objemy vzoriek.
- Pre sériové analýzy sa môže pred vykonaním 7.2.2.3 pripraviť zmes roztoku pufru (4.15), roztoku enzýmov (NAD/diaforázy, 4.16) a roztoku INT (4.17) podľa údajov v tabuľke so zodpovedajúcimi pomermi zmiešania. Z tejto zmesi, ktorá je pri 20 ^{o}C v tme stabilná jednu hodinu, sa pipetuje po 1,00 ml do kyvety.

8. Vyhodnotenie

8.1 Výpočet

Pri stanovovaní reakcií existuje lineárna závislosť medzi vytvoreným/spotrebovaným množstvom NADH, popr. medzi vytvoreným množstvom formazánu a koncentráciou L-mliečnej kyseliny/jantárovej kyseliny, popr. koncentráciou D-3-hydroximaslovej.
Výpočet koncentrácie jednej látky v zriedenom roztoku po absorbčnom fotometrickom meraní je založený na Lambert- Beerovom zákone.

Čo sa týka určenia obsahu kyselín pozri odstavec 10.

8.1.1 Výpočet obsahu kyseliny L-mliečnej

$$\Delta E_{LM} = (E_2 - E_1)_{roztok\ \ vzorky} - (E_1 - E_2)_{blank}$$

(LM = kyselina L- mliečna)

Obsah kyseliny L-mliečnej v mg/kg sušiny vzorky sa ráta podľa nasledovnej rovnice:

$$\omega = \frac{\Delta E_{L-M}.M_{LM}.V_3.V_1.F.100}{\varepsilon.\delta.m.TM}$$

ΔE_{LM}= zmena extikcie po premene kyseliny L-mliečnej
M_{LM} = mólová hmotnosť kyseliny L-mliečnej = 90,1 g/mol
V_1 = celkový objem roztoku vzorky (odst.7.2.1) v ml (=g) (tu: V_1 = 100 ml)
V_2 = celkový objem meraného roztoku (odst.7.2.2.1) nastavený objem roztoku vzorky v ml (tu: V_2 = 0,1 ml)
V_3 = celkový objem meraného roztoku (odst.7.2.2.1) v kyvete v ml (tu: V_3 = 2,24 ml)
ε = mólový extinkčný koeficient NADH:
pri 340 nm = 6,3 l . $mmol^{-1}.cm^{-1}$
Hg 334 nm = 6,18 l . $mmol^{-1}.cm^{-1}$
δ = hrúbka kyvety v cm (tu: 1 cm)
m = navážka vzorky v g
F = faktor riedenia (tu: F=1)
TM = sušina vzorky v g/100 g

Ak nie sú odchýlky od schémy pipetovania (odst. 7.2.1) a roztok vzorky sa ďalej neriedi potom je:

$$\omega = \frac{20182400}{\varepsilon.m.TM}.\Delta E_{LM}$$

Výsledok sa zaokrúhľuje na 3 desatinné miesta.

8.1.2 Výpočet obsahu kyseliny jantárovej

$$\Delta E_B = (E_1 - E_2)_{roztokvzorky} - (E_1 - E_2)_{blank}$$

(B = kyselina jantárová)

Obsah kyseliny jantarovej v mg/kg sušiny vzorky sa ráta podľa nasledovnej rovnice:

$$\omega = \frac{\Delta E_B.M_B.V_3.V_1.F.100}{c.\delta.V_2.m.TM}$$

ΔE_{LB}= zmena extikcie po premene kyseliny jantárovej

M_{LB} = mólová hmotnosť kyseliny jantárovej= 118,1 g/mol
V_1 = celkový objem meraného roztoku (odst.7.2.1) v ml (=g) (tu: V_1 = 100 ml)
V_2 = pre prípravu meraného roztoku (odst.7.2.2.2) nastavený objem roztoku vzorky v ml (tu: V_2 = 1,00 ml)
V_3 = celkový objem meraného roztoku (odst.7.2.2.2) v kyvete v ml (tu: V_3 = 3,27 ml)
ε = mólový extinkčný koeficient NADH:
pri 340 nm = 6,3 l . $mmol^{-1}.cm^{-1}$
Hg 334 nm = 6,18 l . $mmol^{-1}.cm^{-1}$
δ = hrúbka kyvety v cm (tu: 1 cm)
m = navážka vzorky v g
F = faktor riedenia (tu: F=1)
TM = sušina vzorky v g/100 g
Ak nie sú odchýlky od schémy pipetovania (odst. 7.2.2.2) a roztok vzorky sa ďalej neriedi potom je:

$$\omega = \frac{3861900}{\varepsilon.m.TM}.\Delta E_B$$

Výsledok sa zaokrúhľuje na 2 desatinné miesta.

8.1.3 Výpočet obsahu kyseliny D-3-hydroximaslovej

$$\Delta E_{HB} = \left[(E_2 - E_1)_{roztok\ \ vzorky} - 2.(E_3 - E_2)_{2\,roztok\ vzorky}\right]$$

$$-\left[(E_2 - E_1)_{blank} - 2.(E_3 - E_2)_{blank}\right]$$

(HB = D-3-hydroximaslová kyselina)

Obsah kyseliny D-3-hydroximaslovej v mg/kg sušiny vzorky sa ráta podľa nasledovnej rovnice:

$$\omega = \frac{\Delta E_{HB}.M_{HB}.V_3.V_1.F.100}{c.\delta.V_2.m.TM}$$

ΔE_B= zmena extinkcie po premene kyseliny D-3-hydroximaslovej
M_B = mólová hmotnosť kyseliny D-3-hydroximaslovej = 104,1 g/mol
V_1 = celkový objem roztoku vzorky (odst.7.2.1) v ml (=g) (tu: V_1 = 100 ml)
V_2 = objem pre prípravu meraného roztoku (odst.7.2.2.3) nastavený objem roztoku vzorky v ml (tu: V_2 = 1,00 ml)
V_3 = celkový objem meraného roztoku (odst.7.2.2.3) v kyvete v ml (tu: V_3 = 3,05 ml)
ε = mólový extinkčný koeficient INT formazánu:
pri 492 nm = 19,9 l $mmol^{-1}.cm^{-1}$
δ = hrúbka kyvety v cm (tu: 1 cm)
m = navážka vzorky v g
F = faktor riedenia (tu: F=1)
TM = sušina vzorky v g/100 g
Ak nie sú odchýlky od schémy pipetovania (odst. 7.2.2.3) a roztok vzorky sa ďalej neriedi potom je:

$$\omega = \frac{159550}{m.TM}.\Delta E_{HB}$$

Výsledok sa zaokrúhli na 2 desatinné miesta.

8.2 Spoľahlivosť metódy

Nasledujúce údaje boli zistené v kruhovom teste so sušenou vaječnou zmesou s obsahom:
Kyseliny L-mliečnej s asi 240 mg/kg,
Kyseliny jantarovej s asi 11 mg/kg,
Kyseliny D-3-hydroximaslovej s asi 4 mg/kg
Sušina prášku bola 90-95 % a nebola zohľadnená pri výpočtoch.

8.2.1 Opakovateľnosť (r)

Kyselina L-mliečna: r = 62,8 mg/kg; $S_{(r)}$ = ± 22,2 mg/kg
Kyselina jantarová: r = 6,8 mg/kg; $S_{(r)}$ = ± 2,4 mg/kg
Kyselina D-3-hydroximaslová = r = 3,0 mg/kg; $S_{(r)}$ = ± 1,1 mg/kg

8.2.2 Reprodukovateľnosť (R)

Kyselina L-mliečna: R = 89,1 mg/kg; $S_{(R)}$ = ± 31,5 mg/kg
Kyselina jantarová: R= 12,1 mg/kg; $S_{(R)}$ = ± 4,3 mg/kg
Kyselina D-3-hydroximaslová = R = 4,1 mg/kg; $S_{(R)}$ = ± 1,5 mg/kg

9. Protokol o skúške

Protokol musí najmenej obsahovať:

- typ a pôvod vzorky
- dátum odobratia vzorky
- dátum príjmu a skúšania vzorky
- použitá metóda
- výsledok skúšania

Protokol o skúške musí obsahovať všetky informácie potrebné na úplnú identifikáciu vzorky.

Literatúra:

Úradná zbierka vyšetrovacích metód podľa § 35 nemeckého zákona o potravinách. Metóda 05.00 Vyšetrovanie potravín. Stanovenie kyseliny L-mliečnej, kyseliny jantárovej a kyseliny D-3-hydroximaslovej.

Citlivosť, detekčný limit a linearita, ak sa pracuje s testmi od firmy BOEHRINGER MANNHEIM

Kyselina L-mliečna

Citlivosť metódy – najmenší rozdiel absorbancií pre tento postup je 0,005, to predstavuje pre maximálny objem roztoku v kyvete (v=1,000ml) a pri vlnovej dĺžke 340 nm 0,15 mg kyseliny L-mliečnej/1000ml roztoku vzorky, (ak v=0,100ml, obsah kyseliny L-mliečnej je 1,5 mg/1000ml roztoku vzorky)
Medza stanovenia je 0,3mg kyseliny L-mliečnej /1000 ml roztoku čo predstavuje rozdiel absorbancií 0,010 (ak sa meria pri 340 nm a pri maximálnom objeme roztoku vzorky v kyvete v=1,000ml)
Linearita tohto stanovenia je od 0,3 mg kyseliny L-mliečnej/1000ml roztoku vzorky pre objem vzorky v kyvete v=1,000ml, do 0,35g kyseliny L-mliečnej/1000ml roztoku vzorky pre objem vzorky v kyvete v=0,100ml
Správnosť merania - pri paralelnom stanovení sa môže vyskytnúť rozdiel absorbancií od 0,005 do 0,01

Kyselina jantárová

Citlivosť metódy – najmenší rozdiel absorbancií pre tento postup je 0,005, to predstavuje pre maximálny objem roztoku v kyvete (v=2,000ml) a pri vlnovej dĺžke 340 nm 0,15 mg kyseliny jantárovej/1000ml roztoku vzorky, (ak v=0,100ml, obsah kyseliny jantárovej je 3mg/1000ml roztoku vzorky)
Medza stanovenia je 0,6mg kyseliny jantárovej /1000 ml roztoku čo predstavuje rozdiel absorbancií 0,020 (ak sa meria pri 340 nm a pri maximálnom objeme roztoku vzorky v kyvete v=2,000ml)
Linearita tohto stanovenia je od 0,6 mg kyseliny jantárovej/1000ml roztoku vzorky pre objem vzorky v kyvete v=2,000ml, do 0,4g kyseliny jantárovej/1000ml roztoku vzorky pre objem vzorky v kyvete v=0,100ml
Správnosť merania - pri paralelnom stanovení sa môže vyskytnúť rozdiel absorbancií od 0,005 do 0,01

Kyselina D-3-hydroximaslová

Citlivosť metódy – najmenší rozdiel absorbancií pre tento postup je 0,005, to predstavuje pre maximálny objem roztoku v kyvete (v=2,000ml) 0,04 mg kyseliny D-3-hydroximaslovej/1000ml roztoku vzorky, (ak v=0,100ml, obsah kyseliny D-3-hydroximaslovej je 0,8mg/1000ml roztoku vzorky)
Medza stanovenia je 0,2mg kyseliny D-3-hydroximaslovej /1000 ml roztoku čo predstavuje rozdiel absorbancií 0,020 (pre objem roztoku vzorky v kyvete v=2,000ml)
Linearita tohto stanovenia je od 0,2 mg kyseliny D-3-hydroximaslovej/1000ml roztoku vzorky pre objem vzorky v kyvete v=2,000ml, do 0,12g kyseliny D-3-hydroximaslovej/1000ml roztoku vzorky pre objem vzorky v kyvete v=0,100ml
Správnosť merania - pri paralelnom stanovení sa môže vyskytnúť rozdiel absorbancií od 0,005 do 0,01