

D-Isocitronensäure

UV-Test

zur Bestimmung von D-Isocitronensäure und deren Estern (bzw. Lactonen) in Lebensmitteln und anderen Probematerialien

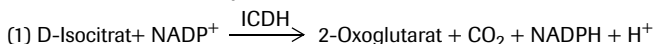
Bestimmung von Gesamt-D-Isocitronensäure nach Wallrauch s. Pkt. 13

Best. Nr. 10 414 433 035

Test-Combination für 33 Bestimmungen

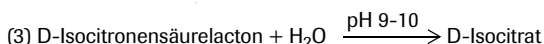
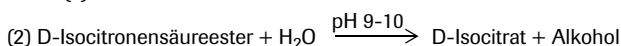
Prinzip (Lit. 1)

D-Isocitronensäure (D-Isocitrat) wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP) in Gegenwart des Enzyms Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH) oxidativ decarboxyliert (1).



Die bei dieser Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der D-Isocitrat-Menge proportional. NADPH ist Messgröße und aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm zu bestimmen.

Gebundene D-Isocitronensäure (Ester, Lactone) wird nach alkalischer Hydrolyse (2,3) (s. Hinweise unter 12 und 13) nach demselben Prinzip bestimmt (1).



Die Test-Combination enthält

- Flasche 1 mit ca. 30 ml Lösung, zusammengesetzt aus:
Imidazol-Puffer, pH ca. 7,1
- Flasche 2 mit ca. 60 mg Lyophilisat, zusammengesetzt aus:
NADP, ca. 45 mg; Mangansulfat
- Flasche 3 mit Lyophilisat ICDH, ca. 5 U

Herstellung der Lösungen

- Inhalt der Flasche 2 mit dem Gesamteinhalt der Flasche 1 lösen (= Lösung 2).
- Inhalt der Flasche 3 mit 1,8 ml bidest. Wasser lösen (= Lösung 3).

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 4 Wochen, bei -15 bis -25°C ca. 2 Monate haltbar.

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

Lösung 3 ist bei 2-8°C 4 Wochen, bei -15 bis -25°C 2 Monate haltbar.

Bestimmungsansatz

Wellenlänge¹: 340 nm, Hg 365 nm oder Hg 334 nm

Glasküvette²: 1,00 cm Schichtdicke

Temperatur: 20-25°C

Testvolumen: 3,050 ml

Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette) oder gegen Wasser

Probeflösung: 2-100 µg D-Isocitronensäure/Ansatz³ (in 0,100-2,000 ml Probevolumen)

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Lösung 2	1,000 ml	1,000 ml
Probeflösung*	-	0,100 ml
bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml
mischen**, nach ca. 3 min Extinktionen der Lösungen messen (E ₁). Reaktion starten durch Zugabe von		
Lösung 3	0,050 ml	0,050 ml
mischen**, Stillstand der Reaktion abwarten (ca. 10 min) und Extinktionen der Lösungen messen (E ₂). Falls die Reaktion nach 10 min nicht zum Stillstand gekommen ist, Extinktionen weiter in 2 min-Abständen messen, bis eine konstante Extinktionszunahme pro 2 min erreicht ist.		

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

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

BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik

Nur zur Verwendung in der Lebensmittelhygiene.

Lagern bei 2-8°C

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

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:

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

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

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

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient von NADPH bei:

$$340 \text{ nm} = 6,3 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

$$\text{Hg } 365 \text{ nm} = 3,5 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

$$\text{Hg } 334 \text{ nm} = 6,18 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$$

Hieraus ergibt sich für D-Isocitronensäure:

$$c = \frac{3,050 \times 192,1}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E = \frac{5,859}{\epsilon} \times \Delta E \text{ [g Isocitronensäure/l Probeflösung]}$$

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

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

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

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Menge an D-Isocitronensäure zwischen 3 µg und 100 µg (Messung bei 365 nm) bzw. 2 µg und 50 µg (Messung bei 340, 334 nm) betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probeflösung soweit zu verdünnen, dass die Konzentration an D-Isocitronensäure zwischen 0,2 und 1,0 g/l bzw. 0,1 und 0,5 g/l liegt.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge D-Isocitronensäure im Liter Messung bei		Verdünnung mit Wasser	Verdünnungs- faktor F
340 oder 334 nm	365 nm		
< 0,5 g	< 1 g	-	1
0,5-5,0 g	1,0-10,0 g	1 + 9	10
> 5,0 g	> 10,0 g	1 + 99	100

Ist die gemessene Extinktionsdifferenz (ΔE) zu klein (z. B. < 0,100), so ist die Probeflösung erneut herzustellen (höhere Einwaage oder weniger starke Verdünnung), oder das in die Küvette zu pipettierende Probevolumen (v) ist bis auf 2,000 ml zu erhöhen, Probe im Bedarfsfall neutralisieren. 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.

- Das Absorptionsmaximum von NADPH liegt bei 340 nm. Bei Verwendung von Spektralphotometern wird im Absorptionsmaximum, bei Verwendung von Spektral-Linienphotometern mit Hg-Dampflampe bei einer Messstrahlung von 365 nm oder 334 nm gemessen.
- Anstelle von Glasküvetten sind auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.
- Siehe Hinweise zur Testdurchführung
- Zu beziehen von Roche Applied Science

2. Technische Hinweise

Die Wallrauch'sche Fällungstechnik (Lit. 3.3 und 2.4) hat sich in der Fruchtsaftanalytik sehr gut bewährt.

Es wird empfohlen, die zu verwendende Salzsäure (HCl, 4 M) gegen die Natronlauge (NaOH; 4 M) zu titrieren (pH-Elektrode; pH-Indikator-Papier).

Bei "stark sauren" Proben (z.B. Grapefruitsaft) ist das Volumen der Ammoniak-Lösung (25%) zu erhöhen: 2,5 ml anstelle 2,0 ml, da sonst zu niedrige Ergebnisse erhalten werden. Alternativ "stark saure" Probe vor der Analyse neutralisieren.

Für Wiederfindungsversuche kann D,L-Isocitrat- $\text{Na}_3 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ verwendet werden. Bei der Berechnung von Ergebnissen muss die Molmasse des Dihydrats verwendet werden; weiterhin ist zu berücksichtigen, dass nur die D-Form enzymatisch umgesetzt wird.

3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

3.1 Das Enzym Isocitrat-Dehydrogenase katalysiert spezifisch die Oxidation von D-Isocitrat.

3.2 ICDH-Präparate enthalten oft Spuren von L-Malat-Dehydrogenase und Aconitase. Trotzdem stören L-Äpfelsäure in 100-fachem Überschuss und Citronensäure in 200-fachem Überschuss die Isocitrat-Bestimmung nicht. Bei Anwesenheit grösserer Mengen L-Äpfelsäure und Citronensäure tritt eine probeabhängige "Schleichreaktion" auf, welche durch Extrapolation bei der Berechnung berücksichtigt werden kann (s. "Bestimmungsansatz", Pipettierschema).

Bei der Analyse von Reinsubstanz Trisodium-D,L-isocitrat-dihydrat (Molmasse 294,1) ist mit Ergebnissen von ca. 50% zu rechnen. (Es wird enzymatisch nur die D-Form gemessen.)

4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen $v = 2,000 \text{ ml}$ und bei der Messung bei 340 nm einer D-Isocitronensäure-Konzentration von 0,25 mg/l Probeflösung (bei $v = 0,100 \text{ ml}$ entsprechend 5 mg/l Probeflösung).

Die Nachweisgrenze von 1 mg/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,020 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probevolumen $v = 2,000 \text{ ml}$.

5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von 2 μg D-Isocitronensäure/Ansatz (1 mg D-Isocitronensäure/l Probeflösung; Probevolumen $v = 2,000 \text{ ml}$) bis 100 μg D-Isocitronensäure/Ansatz (1 g D-Isocitronensäure/l Probeflösung; Probevolumen $v = 0,100 \text{ ml}$).

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 $v = 0,100 \text{ ml}$ und Messung bei 340 nm einer Konzentration von ca. 5-10 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. 0,05-0,1 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten veröffentlicht:

$x = 40 \text{ mg/l}$ Orangensaft VK = 6 % (Lit. 1.1)

$x = 33 \mu\text{g/Test}$	VK = 0,70 %	$n = 16$
$x = 67 \mu\text{g/Test}$	VK = 0,58 %	$n = 16$
$x = 133 \mu\text{g/Test}$	VK = 0,69 %	$n = 16$

(Lit. 1.2)

Fruchtsaft:

$r = 2,5 \text{ mg/l}$	$s_{(r)} = \pm 0,8944 \text{ mg/l}$	
$R = 4,4 \text{ mg/l}$	$s_{(R)} = \pm 1,5665 \text{ mg/l}$	(Lit. 2.4)

7. Störungen

Eisen-Ionen in grösseren Konzentrationen ($> 0,8 \mu\text{g/Ansatz}$) stören den Test durch Trübungsbildung. Bei ihrer Anwesenheit Probeflösung in den alkalischen Bereich bringen ($\text{pH} > 8,0$) und ca. 5 min stehen lassen. Lösung filtrieren und ggf. auf pH 7,0-7,5 einstellen.

Sulfit-Ionen in höheren Konzentrationen ($> 30 \mu\text{g/Ansatz}$) verursachen eine leichte Schleichreaktion durch Abbau von NADPH. Durch Extrapolation der Extinktion (E_2) auf den Zeitpunkt der Zugabe von Lösung 3 (ICDH) zum Test kann der richtige Extinktionswert ermittelt werden.

8. Erkennen von Störungen

8.1 Ist die Umsetzung von D-Isocitronensäure 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/L-Isocitrat (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-Isocitronensäure 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 oder leicht gefärbte und annähernd neutrale Proben direkt, nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle oder mit einem Probevolumen bis 2,000 ml zum Test einsetzen;

trübe Lösungen filtrieren;

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

saure Proben die unverdünnt zum Test eingesetzt werden, durch Zugabe von Kalilauge oder Natronlauge auf ca. pH 7-7,5 einstellen;

saure und schwach gefärbte Proben mit Kalilauge oder Natronlauge auf pH 7-7,5 einstellen und ca. 30 min stehen lassen;

"stärker gefärbte" Proben (ggf. auf pH 7-7,5 eingestellt) gegen Probeleerwert (= 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 Bentonit oder Polyvinylpyrrolidon, PVPP (z.B. 1 g/100 ml), behandeln;

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

Fett-haltige Proben mit heissem Wasser extrahieren (Extraktionstemperatur über dem Schmelzpunkt des jeweiligen Fettes), zur Abscheidung des Fettes abkühlen lassen, Messkolben bis zur Marke auffüllen, 15 min in Eisbad stellen und filtrieren.

11. Anwendungsbeispiele

Bestimmung von D-Isocitronensäure in gefärbten Säften

25 ml filtrierter Probeflösung mit Natronlauge (2 M) auf pH 7,0-7,5 bringen und mit bidest. Wasser auf 50 ml verdünnen (Messkolben). Lösung ca. 10 min bei 20-25°C stehen lassen. Verdünnte Probeflösung mit 0,5 g Polyvinylpyrrolidon (PVPP) oder Bentonit versetzen, 1 min lang rühren und filtrieren. Klare, gegebenenfalls leicht gefärbte Lösung zum Test einsetzen.

Stark saure Probeflösungen, die unverdünnt zum Test eingesetzt werden, müssen vorher neutralisiert werden.

12. Bestimmung von Gesamt-D-Isocitronensäure

(Freie D-Isocitronensäure + gebundene D-Isocitronensäure, wie Ester und Lactone)

25 ml Probelösung in einem Erlenmeyerkolben mit Natronlauge (2 M) auf pH 10-11 bringen, bei Anwesenheit von reduzierenden Substanzen gegebenenfalls 0,01 ml Wasserstoffperoxid (30%, w/v) hinzufügen und 20 min in ein siedendes Wasserbad stellen. Gelegentlich pH überprüfen und gegebenenfalls mit Natronlauge nachstellen. Lösung auf 20-25°C abkühlen und mit Salzsäure (1 M) auf pH 6,9-7,2 einstellen. Probelösung in 50 ml Messkolben quantitativ überführen und 0,2 g Bentonit hinzufügen. Etwa 1 min lang rühren (Magnetrührer) und mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen. Mischen und filtrieren. Klare Lösung, gegebenenfalls verdünnen, zum Test einsetzen.

Die Differenz zwischen Gesamt-D-Isocitronensäure und freier D-Isocitronensäure stellt die gebundene D-Isocitronensäure (z.B. Ester oder Lacton) dar.

13. Weitere Hinweise zur Bestimmung von Gesamt-D-Isocitronensäure nach Wallrauch

Die Bestimmung der D-Isocitronensäure und deren Ester in Buntsäften kann auch gemäss der Methode nach Wallrauch und Greiner vorteilhaft ausgeführt werden (s. Lit. 3.3). Für zuverlässige Messungen ist die Anwendung einer geeigneten Aktivkohle-Qualität erforderlich.

Reagenzien

Aceton, p. a.

Ammoniak-Lösung, 25%, p. a.

Bariumchlorid, $\text{BaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, p. a.

Natriumsulfat, p. a.

Aktivkohle

Tris (hydroxymethyl)aminomethan, Tris, Best.-Nr. 127 434⁴

Ethylendiamintetraacetat, $\text{EDTA-Na}_2\text{H}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

Herstellung der Lösungen

Bariumchlorid-Lösung:

30 g $\text{BaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ mit bidest. Wasser lösen und auf 100 ml auffüllen.

Natriumsulfat-Lösung:

71 g Na_2SO_4 mit bidest. Wasser lösen und auf 1 l auffüllen.

Tris-Pufferlösung, pH 7,0:

2,42 g Tris und 35 mg EDTA mit 80 ml bidest. Wasser lösen, mit Salzsäure (1 M) auf pH 7,0 einstellen und mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen.

Durchführung der Bestimmung (Fällungsmethode, s. Lit. 2.4 und 3.3)

Im 100 ml-Zentrifugenglas 10 ml Probelösung, ggf. nach Neutralisation (s. Pkt. 2), mit 5 ml Natronlauge (4 M) 10 min lang stehenlassen. Anschließend nacheinander 5 ml Salzsäure (4 M), 2 ml Ammoniak-Lösung (25%), 3 ml BaCl_2 -Lösung und 20 ml Aceton zugeben. Gründlich durchmischen und 10 min stehenlassen. Mischung 5 min zentrifugieren.

Überstehende Flüssigkeit vorsichtig dekantieren, 20 ml Na_2SO_4 -Lösung zum Niederschlag geben und Niederschlag im Zentrifugenglas mit einem Glasstab verrühren. Im siedenden Wasserbad 10 min lang unter häufigem Rühren erhitzen. Nach Abkühlen Inhalt des Zentrifugenglases quantitativ in einen 50 ml-Messkolben überspülen und mit Tris-Pufferlösung bis zur Marke auffüllen. Inhalt des Messkolbens in einen Erlenmeyerkolben, in den vorher 1 g Aktivkohle eingewägt wurde, füllen, mischen, 5 min stehenlassen und filtrieren. Farblose, klare Lösung mit $v = 1,000$ ml zum Test einsetzen.

Geändertes Probevolumen v in der Berechnungsformel entsprechend berücksichtigen.

14. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch in der Forschung bei der Analytik von biologischen Proben anwendbar. Zu Probenahme, Behandlung und Stabilität der Probe s. Literatur 1.1 und 1.2.

Literatur

- 1.1 Siebert, F. (1974) in Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1616-1619, Verlag Chemie, Weinheim, und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1570-1573, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc. New York and London
- 1.2 Beutler, H.-O. (1985) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VII, pp. 13-19, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- 2.1 Norme Française Homologuée NF V 76-104 (Oktober 1980) Jus de Fruits et Jus de Légumes, Détermination de la Teneur en Acides Carboxyliques (L-malique, tartrique, citrique, et isocitrique)
- 2.2 Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 61B (Enzymatische Bestimmungen)/3.2. (1981), Kapitel 28A (Frucht- und Gemüsesäfte u.a.)/7.6 (1988), Kapitel 34 (Gärungs-essig)/4.6 (1994)
- 2.3 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau **77**, 5
- 2.4 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB; Enzymatische Bestimmung des Gehaltes an D-Isocitronensäure in Frucht- und Gemüsesäften, 31.00-9 (Januar 1997); Enzymatische Bestimmung des Gehaltes an D-Isocitronensäure in Gemüsesäften, 26.26-9 (Januar 1997)
- 2.5 Nederlandse Norm NEN 2844 (1e druk, maart 1984) Vruchtesappen: Bepaling van het totale D-isocitronenzuurgehalte; Enzymatische methode (Fruit juices - Determination of the total D-isocitric acid content - Enzymatic method)
- 2.6 Methodensammlung der Internationalen Fruchtsaft-Union (IFU-Analysen-Methode 54-1984); 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.)
- 2.7 RSK-Werte, die Gesamtdarstellung, Richtwerte und Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen für Fruchtsäfte und Nektare einschliesslich überarbeiteter Analysenmethoden (1987), 1. Auflage, Verlag Flüssiges Obst, D-56370 Eschborn, S. 117-120
- 2.8 Boletín Oficial del Estado (BOE), num. 31 de fecha Viernes 5 febrero de 1988, Orden Ministerial del Enero de 1988 (Spanisches Gesetzblatt Nr. 31, Freitag, den 5. Februar 1988, Ministerialerlass vom 29. Januar 1988)
- 2.9 Deutsche Norm DIN EN 1139 (1994) Frucht- und Gemüsesäfte; Enzymatische Bestimmung des Gehaltes an D-Isocitronensäure, Spektralphotometrische Bestimmung von NADPH (Fruit and vegetable juices; Enzymatic determination of D-isocitric acid content by the NADPH spectrophotometric method)
- 2.10 European Standard EN 1139 (Dec 1994) Fruit and vegetable juices; Enzymatic determination of D-isocitric acid content by the NADPH spectrometric method
- 2.11 Standard der Russischen Föderation / Standard of the Russian Federation / GOSTAN-DART ROSSII GOST R 51128-98 (1998) Fruit and vegetable juices. Method for determination of D-isocitric acid
- 3.1 Lang, B. (1972) Vorkommen und enzymatische Bestimmung von D-Isocitronensäure in Orangen- und Grapefruitsäften, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **68**, 176-179
- 3.2 Bergner-Lang, B. (1977) Neue Ergebnisse zur Bestimmung der Isocitronensäure in Zitrusfrüchten, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **73**, 211-216
- 3.3 Wallrauch, S. & Greiner, G. (1977) Bestimmung der D-Isocitronensäure in Fruchtsäften und alkoholfreien Erfrischungsgetränken, Flüssiges Obst **44**, 241-245
- 3.4 Beurteilung des Saftgehaltes niedersafthaltiger Getränke, 1. Mitteilung: Orangensaftartige Erfrischungsgetränke, Bericht der Arbeitsgruppe "Fruchtsäfte und fruchtsaftartige Getränke" der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) (1979) Der Mineralbrunnen **29**, 126-132
- 3.5 Biegl, H.-J., Faethe, W., Koch, J., Wallrauch, S. & Wucherpfennig, K. (1982) Richtwerte und Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen (RSK-Werte) für Apfelsaft, Traubensaft und Orangensaft, Flüssiges Obst **49**, 188-199
- 3.6 Henniger, G. & Schütz, A. (1987) The Enzymatic Determination of Isocitric Acid in Fruit Juices: Comparison of Test Procedures, Poster-Präsentation bei Association of Official Analytical Chemists Annual International Meeting, San Francisco, CA, USA

D-Isocitronensäure-Testkontroll-Lösung

Die Testkontroll-Lösung dient zur Kontrolle für die enzymatische Bestimmung von D-Isocitronensäure in Lebensmitteln und anderen Probematerialien.

Reagenzien

D,L-Isocitronensäure, tri-Natrium-Salz, di-Hydrat, p.A.

Herstellung der Testkontroll-Lösung

30 mg D,L-tri-Natrium-Isocitrat-di-Hydrat auf 0,1 mg genau einwiegen und im Messkolben mit bidest. Wasser auf 20 ml auffüllen und gründlich mischen (entspricht ca. 0,5 g D-Isocitronensäure/l).

Lösung vor Gebrauch frisch herstellen. Ggf. kann die Lösung portionsweise eingefroren werden.

Anwendung:

1. Zusatz der D,L-Isocitronensäure-Testkontroll-Lösung zum Testansatz:

Die Testkontroll-Lösung wird anstelle der Probelösung zur Bestimmung eingesetzt. (Bei Berechnung der Isocitronensäure-Konzentration der Testkontroll-Lösung ist zu berücksichtigen, dass bei der enzymatischen Bestimmung nur die D-Form gemessen wird.)

Die Messung der Testkontroll-Lösung ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen.

2. "Quantitativer Nachstart":

Nach Ablauf der Reaktion mit Probelösung und Messung von E_2 werden 0,050 ml der Testkontroll-Lösung zum Probeansatz gegeben. Nach Ablauf der Reaktion (ca. 15 min) wird die Extinktion E_3 gemessen. Aus der Differenz ($E_3 - E_2$) 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 dem Ergebnis ab, das gemäss Pkt. 1 ermittelt wurde.

3. Interner Standard:

Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung (keine groben Fehler bei Testansatz; Probe ist frei von Hemmsubstanzen) kann die Testkontroll-Lösung als interner Standard verwendet werden:

In Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe	Standard	Probe + Standard
Lösung 2	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	1,900 ml
Probelösung	-	0,100 ml	-	0,050 ml
Testkontroll-Lsg.	-	-	0,100 ml	0,050 ml

mischen, nach ca. 5 min Extinktionen der Lösungen messen (E_1). 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:

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

4. Wiederfindungsversuch mit Originalproben:

Zur Absicherung der Messung einschliesslich Vorbereitung der Proben können Wiederfindungsversuche durchgeführt werden. Hierfür wird entweder die oben genannte Testkontroll-Lösung verwendet oder aber eine Testkontroll-Lösung mit einer geeigneten Konzentration.

Die Originalprobe wird mit und ohne Zusatz von D-Isocitronensäure gemessen, wobei der Zusatz an D-Isocitronensäure entsprechen soll

- der in der Originalprobe erwarteten D-Isocitronensäure-Menge, oder
- der Menge, die z.B. gemäss Standards oder sonstiger Regelungen in der Originalprobe enthalten sein soll.

Ebenfalls verfügbar:

**Test-Combination Citronensäure,
Best.-Nr. 10 139 076 035**



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

