

UV-Methode für 3 x ca. 8 Ansätze

Nur für den Laborgebrauch
Lagern bei +2°C bis +8°C

Die Methode ist enthalten im deutschen und schweizerischen Lebensmittelrecht und in Europäischen Verordnungen. Empfohlen z. B. von IDF, IFU, AIJN, MEBAK, OIV, VDLUFA. Standardisiert von DIN, EN, GOST, ISO, NEN, NF. Anerkannt durch die AOAC.

Prinzip

- (1) Citrat $\xrightarrow{\text{CL}}$ Oxaloacetat + Acetat
- (2) Oxaloacetat + NADH + H⁺ $\xrightarrow{\text{L-MDH}}$ L-Malat + NAD⁺
(Oxaloacetat $\xrightarrow{\text{Ox-DC/Metall-Ionen}}$ Pyruvat + CO₂)
- (3) Pyruvat + NADH + H⁺ $\xrightarrow{\text{L-LDH}}$ L-Lactat + NAD⁺

Ref.: Möllering, H. & Gruber, W. (1966) Determination of citrate with citrate lyase, Anal.Biochem. 17, 369-376.

Durchführung der Bestimmung

Wellenlänge: 340 nm (NADH); $\epsilon = 6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
 Schichtdicke: 1,00 cm (Glas- oder Plastikkuvette)
 Temperatur: +20 bis +25°C
 Testvolumen: 3,020 ml
 Messung: gegen Luft oder Wasser
 Probelösung: 1 bis 80 µg Citronensäure in 0,200 bis 2,000 ml Probelösung

Reagenzien

- # 1: 3 Flaschen mit Lyophilisat mit Glycylglycin-Puffer, pH ca. 7,8, ca. 110 U L-MDH, ca. 220 U L-LDH, ca. 4 mg NADH (Stabilität siehe Packungsetikett). *Inhalt einer Flasche # 1 mit 9 ml bidest. Wasser lösen.* Die Lösung ist 2 Wochen bei +2 bis +8 °C, bzw. 4 Wochen bei -15 bis -25°C stabil. Lösung # 1 vor Gebrauch auf +20°C bis +25°C bringen.
- # 2: 3 Flaschen mit Lyophilisat mit ca. 10 U Citrat Lyase (Stabilität siehe Packungsetikett). *Inhalt einer Flasche # 2 mit 0,2 ml bidest. Wasser lösen, und 30 min. bei Raumtemperatur stehen lassen.* Die Lösung ist 5 Tage bei +2°C bis +8°C, bzw. 4 Wochen bei -15°C bis -25°C stabil.

Zusätzlich wird benötigt (nicht im Kit enthalten):

Standard-Lösung Citronensäure-monohydrat, ultrapur, 0,4 g/l zur Testkontrolle.

Die Reagenzien zur Bestimmung von Citronensäure sind nicht gefährlich. Die allgemeinen Regeln beim Arbeiten in chemischen Laboratorien sollten jedoch eingehalten werden. Nach Gebrauch können die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgt werden. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

Bestimmungsansatz

In Küvetten pipettieren:	Leerwert	Standard ¹	Probe ²	Ansatz Duplikat Probe ³	Ansatz mit internem Standard ⁴	Ansatz für Spuren-analytik ⁵
Glycylglycin-Puffer, L-MDH, L-LDH, NADH-Lösung # 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Probelösung⁶ (z. B. 0,04 bis 0,4 g Citronensäure/l)	-	-	0,200 ml	0,100 ml	0,100 ml	2,000 ml
Standardlösung (z.B. 0,4 g Citronensäure/l)	-	0,200 ml	-	-	0,100 ml	-
Bidest. Wasser	2,000 ml	1,800 ml	1,800 ml	1,900 ml	1,800 ml	-
Mischen⁷, nach ca. 5 min Extinktionen E₁ messen. Zugeben:						
CL-Lösung # 2	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Mischen⁷, nach Ende der Reaktion (ca. 5 bis 10 min) Extinktionen (E₂) messen.						

Hinweise

- 1 Das Mitführen eines "Standards" dient ausschließlich zur Erkennung von Unregelmäßigkeiten in der Analyse. Die Messung des Standards wird nicht benötigt zur Berechnung von Ergebnissen.
- 2 Dieser Ansatz zusammen mit dem Leerwert ist eine „Einzelbestimmung“.
- 3 Im Fall einer "Doppelbestimmung" werden 2 Ansätze mit verschiedenen Probevolumina ausgeführt. Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein. Ergebnisse mit den entsprechenden Probevolumina v berechnen.

- 4 Wiederfindung = $[(2 \times \Delta E_{\text{Probe+Standard}} - \Delta E_{\text{Probe}}) / \Delta E_{\text{Standard}}] \times 100 [\%]$.
- 5 In der Spurenanalytik wird empfohlen, das Probevolumen bis zu 2,000 ml (0,0005 bis 0,04 g Citronensäure/l) zu erhöhen.
- 6 Vor der Dosierung Enzympipetten, bzw. Spitzen der Kolbenhubpipetten mit Probe- bzw. Standardlösung mehrfach vorspülen.
- 7 z.B. mit einem Plastikspatel, oder durch Umschwenken nach Verschließen der Küvette mit Parafilm® (American Can Co., Greenwich Ct., USA)

Berechnung⁸

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

Um gesicherte, reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten sollte die Extinktionsdifferenz ΔE zwischen 0,100 und 1,000 betragen.

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

$$c = (3,020 \times 192,1 (210,1) \times \Delta E) / (6,3 \times 1,00 \times 0,200 \times 1000) = \mathbf{0,460 (0,504) \times \Delta E \text{ [g Citronensäure (-monohydrat)/l Probelösung]}}$$

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

Bei der Analyse von Proben die für die Analyse eingewogen werden, wird das Ergebnis auf die Einwaage bezogen:

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

Vorbereitung der Proben

Testergebnisse werden durch die untenstehenden Probeeigenschaften beeinflusst. Im treffenden Fall muss die entsprechende Probevorbereitung durchgeführt werden.

- Klare, farblose, annähernd neutrale flüssige Proben* ggf. verdünnen, um eine Probelösung mit 0,04 bis 0,4 g Citronensäure/l zu erhalten.
- Trübe Lösungen* filtrieren oder zentrifugieren, ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
- Kohlensäurehaltige Proben*, z. B. durch Filtration entgasen, oder NaHCO_3 zugeben, bis die Lösung schwach alkalisch ist. Ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
- Saure (insbesondere leicht gefärbte) Lösungen* mit KOH oder NaOH auf pH 8 einstellen, einige Minuten inkubieren, oder im Fall von farblosen Proben ohne pH-Einstellung verdünnen (s. Pkt. 1).
- "Stark gefärbte Lösungen"*, die unverdünnt gemessen werden, mit PVPP oder Polyamid, z. B. 1 g/100 ml, behandeln, mischen, einige Minuten inkubieren, filtrieren.
- Feste Proben* zerkleinern (Korngröße < 0,3 mm), bzw. *halbfeste (pastöse) Proben* homogenisieren, mit Wasser extrahieren, oder in Wasser lösen, filtrieren und ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
- Fetthaltige Proben* mit heißem Wasser (Temperatur über dem Schmelzpunkt des Fettes), z. B. in einem 100 ml-Messkolben extrahieren. Auf +20°C bringen, Messkolben bis zur Marke füllen. 15 min in Eis, bzw. 30 min in Kühlschrank stellen, filtrieren.
- Proben mit Perchlorsäure entproteinieren (eine Methode aus den 3 auswählen):*
 - a [g] Probe (Wassergehalt w in g/100 g) mit b [ml] Perchlorsäure (1 M), homogenisieren, filtrieren. [c] ml Filtrat mit [d] ml KOH (5 M) neutralisieren. 15 min bei +4 °C aufbewahren (Eisbad, oder 30 min im Kühlschrank), filtrieren.
 - a [g] Probe mit b [ml] Perchlorsäure (1 M) homogenisieren. Mit KOH (5 M) neutralisieren. In einen 100 ml-Messkolben überführen, mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen. (Fettschicht ist über der Marke.) 15 min bei +4 °C aufbewahren (Eisbad, oder 30 min im Kühlschrank), filtrieren.
 - a [g] Probe (Wassergehalt w in g/100 g) mit b [ml] Perchlorsäure (1 M) homogenisieren. Mit d [ml] KOH (5 M) neutralisieren. 15 min bei +4 °C aufbewahren (Eisbad, oder 30 min im Kühlschrank), filtrieren.
- Hinweis: Carrez-Klärung wegen zu geringer Wiederfindungsrate (Adsorption von Citronensäure) nicht anwenden.

Eigenschaften des Tests

- Spezifität:** *Spezifisch* für Citronensäure. Bei der Analyse von handelsüblichem Citronensäure-monohydrat sind Ergebnisse von > 100 % zu erwarten, wenn Kristallwasser während der Lagerung verloren geht und die Ergebnisse mit dem Molekulargewicht von Citronensäure-monohydrat berechnet werden.
- Empfindlichkeit:** 0,25 mg/l ($\Delta E = 0,005$; $v = 2,000$ ml; $V = 3,020$ ml)
- Nachweisgrenze:** 0,5 mg/l ($\Delta E = 0,010$; $v = 2,000$ ml; $V = 3,020$ ml)
- Linearität:** 1 µg/Ansatz ($v = 2,000$ ml; $V = 3,020$ ml)
bis 80 µg/Ansatz ($v = 0,200$ ml; $V = 3,020$ ml)
- Präzision:** $\Delta E = \pm 0,005$ bis $0,010$ Extinktionseinheiten
VK = ca. 1 bis 3 %
Fruchtsaft: $r = 0,095 + 0,025 \times C_{\text{Citronensäure}} \text{ in g/l [g/l]}$
 $R = 0,13 + 0,054 \times C_{\text{Citronensäure}} \text{ in g/l [g/l]}$
Wein: < 400 mg/l: $r = 14 \text{ mg/l}$ $R = 39 \text{ mg/l}$
> 400 mg/l: $r = 28 \text{ mg/l}$ $R = 65 \text{ mg/l}$
- Störungen:** Keine bei der Analyse von Lebensmitteln. (Ggf. phenolische Verbindungen im Rahmen der Vorbereitung der Probe entfernen.)
- Technische Hinweise:** Die Berechnung kann als Citronensäure (wird empfohlen) oder als Citronensäure-monohydrat erfolgen.

Hinweise

- Ergebnisse aus der acidimetrischen Bestimmung der 'Gesamtsäure' berechnet als Citronensäure (es werden Protonen gemessen) können nicht mit Ergebnissen aus der enzymatischen Analyse verglichen werden