

Enzymatische UV-Bestimmung von Citronensäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien  
2 x 50 mL R1 und 2 x 12,5 mL R2 – 50 Tests (manuell) / ≥ 500 Tests (Auto-Analysegerät)

Nur für den Laborgebrauch  
Lagerung bei 2 - 8 °C

## Methode

Enzymatische UV-Bestimmung von Citronensäure mit Citratlyase (CL), L-Malat-Dehydrogenase (L-MDH) und L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH).

## Testprinzip

Citronensäure (Citrat) wird in Gegenwart des Enzyms CL in Oxalacetat und Acetat gespalten:

Citronensäure — CL → Oxalacetat + Acetat

Entstehendes Oxalacetat und dessen Decarboxylierungs-Produkt Pyruvat werden in Gegenwart der Enzyme L-MDH und L-LDH zu L-Malat bzw. L-Lactat reduziert:

Oxalacetat + NADH + H<sup>+</sup> — L-MDH → L-Malat + NAD<sup>+</sup>

Pyruvat + NADH + H<sup>+</sup> — L-LDH → L-Lactat + NAD<sup>+</sup>

Reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) wird zu NAD oxidiert. Die verbrauchte Menge an NADH ist der umgesetzten Menge an Citronensäure äquivalent und wird bei 340 nm vermessen.

## Reagenzien

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig.

- Reagenz 1: 2 x 50 mL (NADH, L-MDH, L-LDH)
- Reagenz 2: 2 x 12,5 mL (Puffer, CL)

Die Reagenzien sind bei 2 - 8 °C bis zum Monatsende der Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren. Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Chemikalien sollten beachtet werden. Nicht verschlucken! Berührung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten sind den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (MSDS) auf unserer Internetseite ([www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de)) zu entnehmen. Nach Gebrauch die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgen. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

## Probenvorbereitung

- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen in den Messbereich im Test einsetzen.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Stark gefärbte Proben ggf. mit PVPP entfärben.
- Feste Proben zerkleinern und homogenisieren, geeignete Probemenge einwiegen und mit Wasser extrahieren.
- Zur Klärung proteinhaltiger Proben empfiehlt sich eine Aufarbeitung mit Perchlorsäure oder Trichloressigsäure.
- Carrez-Klärung ist ungeeignet, da Citronensäure absorbiert wird!
- Detaillierter Probenaufarbeitungsleitfaden auf Anfrage erhältlich.

## Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm  
Temperatur: 37 °C oder 20 - 25 °C  
Messung: gegen Luft oder Wasser  
Proben: 25 - 1000 mg/L

	Reagenzleerwert	Probe / Kontrolle
Reagenz 1	2000 µL	2000 µL
Probe / Kontrolle	-	100 µL
Dest. Wasser	100 µL	-
Mischen, 3 min bei 20 - 37 °C inkubieren. Extinktion E <sub>1</sub> messen, dann zugeben:		
Reagenz 2	500 µL	500 µL
Mischen, das Ende der Reaktion abwarten (ca. 15 min bei 20 - 37 °C inkubieren) und Extinktion E <sub>2</sub> messen.		

Der Reagenzleerwert muss bei jedem Lauf einmalig mitbestimmt und von jedem Probenergebnis abgezogen werden.

## Berechnung der Ergebnisse

### Berechnung bei Probelösungen:

$$\Delta E = (E_1 \times df - E_2)_{\text{Probe}} - (E_1 \times df - E_2)_{\text{RLW}}$$

df: dilution factor (Reagenzverdünungsfaktor)  
RLW: Reagenzleerwert

$$df = \frac{(\text{Probenvolumen} + R1)}{(\text{Testvolumen})} = 0,808$$

$$C_{\text{Citronensäure}} [\text{g/L}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(\epsilon \times d \times v \times 1000)}$$

V: Testvolumen [mL] = 2,600  
MG: Molekulargewicht [g/mol] = 192,13  
d: Schichtdicke [cm] = 1,00  
v: Probenvolumen [mL] = 0,100  
ε: Extinktionskoeffizient NADH [l/mmol x cm] = 6,3 (bei 340 nm)

Hieraus ergibt sich für eine Messung bei 340 nm:

$$C_{\text{Citronensäure}} [\text{g/L}] = 0,7929 \times \Delta E$$

### Berechnung bei Feststoffen:

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

## Leistungsdaten

### Spezifität

Der Test ist spezifisch für Citronensäure und zeigt keine Nebenaktivitäten oder Interferenzen mit anderen relevanten Säuren. Sulfit und meso-Weinsäure interferieren nicht bei oder unter 3,13 g/L.

### Linearität & Messbereich

Linearität ist bis 1400 mg/L Citronensäure gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 25 und 1000 mg/L liegt. Wird dieser Bereich überschritten, sollten die Proben mit dest. Wasser auf eine Konzentration innerhalb des Messbereichs verdünnt werden. Der Verdünnungsfaktor ist bei der Berechnung zu berücksichtigen.

### Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze (LoD) und die Quantifizierungsgrenze (LoQ) wurden nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung ermittelt:

- Probenvolumen v = 100 µL: LoD = 15 mg/L  
LoQ = 25 mg/L
- Probenvolumen v = 1000 µL\*: LoD = 2 mg/L  
LoQ = 3 mg/L

\*erhöhtes Probenvolumen erfordert eine pH-Neutralisierung

### Automatisierung & Validierungsberichte

Applikationsempfehlungen für Auto-Analysegeräte und Kundenvalidierungsberichte sind auf Anfrage erhältlich.

### Haftungsausschluss

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. Für darüber hinaus gehende direkte, indirekte Schäden oder sonstige Kosten im Zusammenhang mit der Nutzung der Produkte haftet R-Biopharm nicht.