

ZITRONENSÄURE

PRODUKTANLEITUNG

K-CITR
SKU: 700004274

07/24

Für die Bestimmung von Zitronensäure (Citrat)

(72 manuelle Assays pro Kit) oder
(840 Auto-Analyser-Assays pro Kit) oder
(720 Mikroplatten-Assays pro Kit)



EINFÜHRUNG:

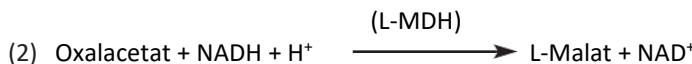
Aufgrund ihrer hervorragenden säuerlichen, aromatisierenden und konservierenden Eigenschaften ist Zitronensäure (Citrat) in einer Vielzahl von natürlichen und verarbeiteten Lebensmitteln und Getränken enthalten, wie z. B. Fruchtsäften und anderen Erfrischungsgetränken, Bier, Milch, Brot, Süßigkeiten sowie Milch- und Fleischprodukten. Diese Säure findet auch viele andere Anwendungen, z. B. in der Papierherstellung oder in der Weinindustrie, wo das Vorliegen erheblicher Mengen auf die Verwendung von Zitronensäure als Säuerungsmittel hinweist. Die zulässige Obergrenze liegt hierbei in der EU bei nur 1 g/l (Endkonzentration). Auch in der klinischen Chemie ist die Quantifizierung von Zitronensäure von Bedeutung. Polyvinylpyrrolidon (PVP) wurde in das Megazyme-Assay-Format integriert, um eine Hemmung durch Tannine zu verhindern, die in Traubensaft, gärendem Most und Wein enthalten sind. Neben einer Haltbarkeit von > 2 Jahren und einem günstigen Preis eignet sich das Produkt auch durch die Möglichkeit manueller Assay-Verfahren (siehe Seite 5 „A“), Autoanalysator-Assay-Verfahren (siehe Seite 7 „B“) und Mikroplatten-Assay-Verfahren (siehe Seite 9 „C“) ideal für Zitronensäure-Bestimmungsanwendungen in Laboratorien jeder Größe.

PRINZIP:

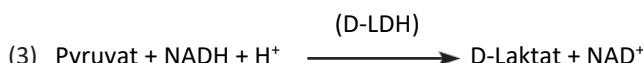
Oxalacetat und Acetat werden durch das Enzym Citratlyase aus Zitronensäure (Citrat) hergestellt (1).



Das Oxalacetatprodukt wird bei Vorliegen von NADH und dem Enzym L-Malat-Dehydrogenase (L-MDH) in L-Malat und NAD⁺ umgewandelt (2).



Ist jedoch das Enzym Oxalacetat-Decarboxylase in der Probe vorhanden, wird ein Teil des Oxalacetatprodukts in Pyruvat umgewandelt. Um sicherzustellen, dass Zitronensäure quantitativ gemessen wird, wird daher D-Lactatdehydrogenase (D-LDH) eingesetzt, um das produzierte Pyruvat effizient in D-Laktat und NAD⁺ umzuwandeln (3).



Die Menge an NAD⁺, die im obigen Reaktionsweg gebildet wird, ist stöchiometrisch mit der Menge an Zitronensäure. Der NADH-Verzehr wird durch die Verringerung des Absorptionsgrads bei 340 nm gemessen.

SPEZIFITÄT, SENSITIVITÄT, LINEARITÄT UND PRÄZISION:

Das Assay ist spezifisch für Zitronensäure. Bei der Analyse von handelsüblichem Zitronensäure-Monohydrat können Ergebnisse von > 100% erwartet werden, da das Kristallisationswasser teilweise verloren geht.

Die kleinste differenzierende Absorption des Assays beträgt 0,005 Absorptionseinheiten. Dies entspricht 0,246 mg/l Probenlösung bei einem maximalen Probenvolumen von 1,7 ml. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,491 mg/l, die sich aus einer Absorptionsdifferenz von 0,010 bei einem Probenvolumen von 1,7 ml ergibt.

Der Assay ist linear über den Bereich von 1,0 bis 100 µg Zitronensäure pro Assay. Bei Duplikatbestimmungen mit einer Probenlösung kann eine Absorptionsdifferenz von 0,005 bis 0,010 auftreten. Bei einem Probenvolumen von 1,7 ml entspricht dies einer Zitronensäurekonzentration von ca. 0,246 bis 0,491 mg/l der Probenlösung. Wenn die Probe während der Probenvorbereitung verdünnt wird, wird das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert. Wird die Probe bei der Probenvorbereitung gewogen, z.B. 10 g/l, ist mit einer Differenz von 0,02 bis 0,05 g/100 g zu rechnen.

INTERFERENZ:

Ist die Umwandlung der Zitronensäure innerhalb der im Assay angegebenen Zeit (ca. 5 min) abgeschlossen, kann in der Regel davon ausgegangen werden, dass keine Interferenz aufgetreten ist. Dies kann eingehend überprüft werden, indem der Küvette nach Abschluss der Reaktion Zitronensäure (ca. 40 µg in 0,2 ml) zugesetzt wird. Es sollte eine signifikante Verringerung der Absorption beobachtet werden.

Störstoffe in der zu analysierenden Probe können durch Verwendung eines internen Standards identifiziert werden. Eine quantitative Rückgewinnung dieses Standards wäre zu erwarten. Dies ist besonders wichtig bei der Analyse von Proben, die freies Pyruvat enthalten, wie z. B. dunkles Bier. Verluste bei der Probenhandhabung und -Extraktion werden durch die Durchführung von Rückgewinnungsexperimenten identifiziert, d. h. durch Zugabe von Zitronensäure zur Probe in den ersten Extraktionsschritten.

SICHERHEIT:

Die allgemeinen Sicherheitsmaßnahmen, die für alle chemischen Stoffe gelten, sollten eingehalten werden.

Weitere Informationen zur sicheren Verwendung und Handhabung dieses Produkts finden Sie im zugehörigen Sicherheitsdatenblatt, das auf den Megazyme- und Neogen-Websites verfügbar ist.

KITS:

Neogen bietet Kits an, die für die Durchführung von 72 Assays im manuellen Format (oder 840 Assays im Auto-Analyser-Format oder 720 Assays im Mikroplattenformat) geeignet sind. Die Kits enthalten die vollständige Assay-Methode plus:

- Flasche 1:** Puffer (40 ml, pH 7,5) plus Natriumazid (0,02%) als Konservierungsmittel.
Bei 4 °C lagern. Für das Ablaufdatum siehe das individuelle Etikett.
- Flasche 2:** NADH plus PVP.
Unter -10 °C lagern. Für das Ablaufdatum siehe das individuelle Etikett.
- Flasche 3:** L-Malat-Dehydrogenase plus D-Laktat-Dehydrogenase, 1,5 ml.
Bei 4 °C lagern. Für das Ablaufdatum siehe das individuelle Etikett.
- Flasche 4: (x 3)** Citrat-Lyase-Lyophilisat.
Unter -10 °C lagern. Für das Ablaufdatum siehe das individuelle Etikett.
- Flasche 5:** Zitronensäure-Standardlösung (5 ml, 0,20 mg/ml) in 0,02 % (w/v)
Natriumazid.
Verschlossen bei 4 °C lagern. Für das Ablaufdatum siehe das individuelle Etikett.

HERSTELLUNG VON REAGENZIENLÖSUNGEN/SUSPENSIONEN:

1. Verwenden Sie den Inhalt von **Flasche 1** wie geliefert.
2. Lösen Sie den Inhalt der **Flasche 2** in 16 ml destilliertem Wasser. Dies ist die **NADH-Lösung. Stabil für ~ 4 Wochen bei 4 °C** oder stabil für > 2 Jahre unter -10 °C (um wiederholte Gefrier-/Auftauzyklen zu vermeiden, in angemessen große Aliquots aufteilen und in Polypropylenrörchen lagern).
3. Verwenden Sie den Inhalt von **Flasche 3** wie geliefert. Die Flasche vor dem ersten Öffnen schütteln, um alle Enzyme zu entfernen, die sich möglicherweise auf dem Gummistopfen abgesetzt haben. Die Flasche anschließend in aufrechter Position lagern. Die Flasche vor der Verwendung schwenken, um den Inhalt zu vermischen.
4. Den Inhalt der **Flasche 4** vorsichtig in 0,55 ml destilliertem Wasser lösen.
Dies ist die **Citrat-Lyase-Lösung**.
Stabil für 1 Tag bei 4 °C oder > 6 Monate unter -10 °C.

HINWEIS: Um eine Rückgewinnung eines ausreichenden Volumens zu gewährleisten, **Flasche 4** während der Auflösung nicht umdrehen und die Flasche immer in aufrechter Position lagern.

5. Verwenden Sie den Inhalt von **Flasche 5** wie geliefert.

HINWEIS: Die Zitronensäure-Standardlösung wird nur dann untersucht, wenn Zweifel an der Genauigkeit des verwendeten Spektralphotometers bestehen oder wenn der Verdacht besteht, dass eine Hemmung durch Substanzen in der Probe verursacht wird. Die Konzentration der Zitronensäure wird direkt aus dem Extinktionskoeffizienten von NADH bestimmt (Seite 6).

AUSRÜSTUNG (EMPFOHLEN):

1. Mischzylinder (50 ml, 100 ml und 500 ml).
2. Einweg-Kunststoffküvetten (1 cm Strahlengang, 3,0 ml).
3. Mikropipettierer, z. B. Gilson Pipetman® (20 µl, 200 µl und 1 ml).
4. Direktverdränger-Pipettierer, z. B. Eppendorf Multipette®
 - Mit 5,0 ml und 25 ml Combitips® (zur Abgabe von Aliquoten aus destilliertem Wasser und Puffer/NADH/PVP-Gemisch).
5. Laborwaage.
6. Spektralphotometer, auf 340 nm eingestellt.
7. Vortexer (z. B. IKA® Yellowline Test Tube Shaker TTS2).
8. Stoppuhr.
9. Whatman No. 1 (9 cm) Papierfilter.

A. MANUELLES ASSAY-VERFAHREN:

Wellenlänge: 340 nm
Küvette: 1 cm Strahlengang (Glas oder Kunststoff)
Temperatur: ~ 25 °C
Endgültiges Volumen: 2,74 ml
Probenlösung: 1,0-100 µg Zitronensäure pro Küvette
(in 0,20-1,7 ml Probenvolumen)

AbleSEN GEGEN LUFT (ohne Küvette im Strahlengang) oder gegen Wasser

In Küvetten pipettieren	Blind	Probe
Probe aus destilliertem Wasser (bei ~ 25 °C)	2,00 ml -	1,80 ml 0,20 ml
Flasche 1	0,50 ml	0,50 ml
NADH-Lösung	0,20 ml	0,20 ml
Flasche 3	0,02 ml	0,02 ml
Mischen*, den Absorptionsgrad der Lösungen (A_1) nach ca. 4 min ablesen und die Reaktionen durch Zugabe der folgenden Stoffe starten:		
Citrat-Lyase-Lösung	0,02 ml	0,02 ml
Mischen* und den Absorptionsgrad der Lösungen (A_2) am Ende der Reaktion ablesen (~ 5 min).		

* z.B. mit einem Kunststoffspatel oder durch sanftes Umdrehen nach dem Verschließen der Küvette mit einer Küvettenkappe oder Parafilm®.

BERECHNUNG:

HINWEIS: Diese Berechnungen können durch die Verwendung des **Mega-Calc™** vereinfacht werden, der im Produktbereich auf der Megazyme-Website (www.megazyme.com) heruntergeladen werden kann.

Die Absorptionsdifferenz ($A_1 - A_2$) für Blindproben und Proben bestimmen.

Die Absorptionsdifferenz der Blindprobe von der Absorptionsdifferenz der Probe subtrahieren, wodurch $\Delta A_{\text{Zitronensäure}}$ erhalten wird.

Der Wert von $\Delta A_{\text{Zitronensäure}}$ sollte in der Regel mindestens 0,100 Absorptionseinheiten betragen, um ausreichend genaue Ergebnisse zu erzielen.

Die Konzentration von Zitronensäure kann wie folgt berechnet werden:

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A_{\text{Zitronensäure}} \quad [\text{g/l}]$$

wobei:

- V = endgültiges Volumen [ml]
MW = Molekulargewicht der Zitronensäure [g/mol]
 ε = Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm
= 6300 [$\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
d = Strahlengang [cm]
v = Probenvolumen [ml]

Für Zitronensäure gilt:

$$c = \frac{2,74 \times 192,1}{6300 \times 1,0 \times 0,20} \times \Delta A_{\text{Zitronensäure}} \quad [\text{g/l}]$$
$$= 0,4177 \times \Delta A_{\text{Zitronensäure}} \quad [\text{g/l}]$$

Wurde die Probe während der Vorbereitung verdünnt, ist das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F zu multiplizieren.

Bei der Analyse von festen und halbfesten Proben, die für die Probenvorbereitung gewogen werden, wird der Gehalt (g/100 g) aus der gewogenen Menge wie folgt berechnet:

Gehalt an Zitronensäure

$$= \frac{\text{Zitronensäure } [\text{g/l Probenlösung}]}{\text{Gewicht}_{\text{Probe}} [\text{g/l Probenlösung}]} \times 100 \quad [\text{g/100 g}]$$

B. AUTO-ANALYSER-ASSAYVERFAHREN:

Die Reagenzienvorbereitung wird wie folgt durchgeführt:

Vorbereitung von R1:

Bestandteil	Volumen
destilliertes Wasser Flasche 1 NADH-Lösung	51,5 ml 13 ml 5 ml (nach Zugabe von 16 ml H ₂ O in Flasche 2)
Flasche 3	0,5 ml
Gesamtvolumen	70 ml

Vorbereitung von R2:

Bestandteil	Volumen
Citrat-Lyase-Lösung	7 ml Wasser zu Flasche 4 hinzugeben
Gesamtvolumen	7 ml

BEISPIELMETHODEN:

R1: 0,25 ml

Probe: ~ 0,003 ml

R2: 0,025 ml

Reaktionszeit: 5 min bei 25 °C oder 37 °C

Wellenlänge: 340 nm

Stabilität des vorbereiteten Reagenz: 5 Tage im Kühlschrank

Berechnung: Endpunkt

Reaktionsrichtung: Abnahme

Linearität: bis zu 33 µg/ml Zitronensäure im endgültigen Reaktionsgemisch

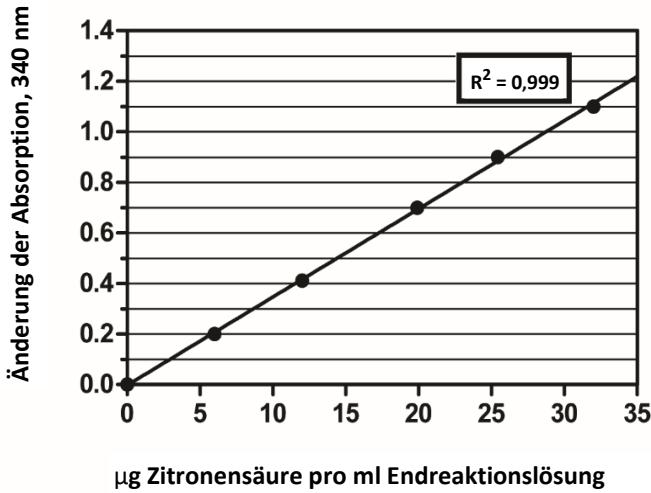


Abbildung 1. Kalibrierkurve, die die Linearität des aus K-CITR hergestellten Reagenzes zeigt. Die Reaktionen, die zur Erstellung dieser Kalibrierkurve verwendet wurden, wurden 5 Minuten lang bei 25 °C mit einer Küvette mit 10 mm Pfadlänge durchgeführt.

C. MIKROPLATTEN-ASSAY-VERFAHREN:

HINWEISE:

- Das Mikroplatten-Assay-Verfahren für Zitronensäure kann entweder mit einem Single-Point-Standard oder einer vollständigen Kalibrierungskurve durchgeführt werden.
- Für jede Probencharge, die zur Bestimmung von Zitronensäure **verwendet wird**, muss entweder ein Single-Point-Standard oder eine Kalibrierungskurve gleichzeitig mit derselben Charge von Reagenzien durchgeführt werden.

Wellenlänge: 340 nm

Mikroplatte: 96 Wells (z. B. durchsichtig mit flachem Boden, Glas oder Kunststoff)

Temperatur: ~ 25 °C

Endgültiges Volumen: 0,274 ml

Linearität: 0,1-10 µg Zitronensäure pro Well
(in 0,02-0,17 ml Probenvolumen)

In die Wells pipettieren	Blind	Probe	Standard
Flasche 5 mit destillierter Wasserprobenlösung	0,200 ml - -	0,180 ml 0,020 ml -	0,180 ml - 0,020 ml
Flasche 1	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
NADH-Lösung	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Flasche 3	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml
Mischen*, den Absorptionsgrad der Lösungen (A_1) nach ca. 4 min ablesen und die Reaktionen durch Zugabe der folgenden Stoffe starten:			
Citrat-Lyase-Lösung	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml
Mischen* und die Absorptionsgrade der Lösungen (A_2) am Ende der Reaktion ablesen (ca. 5 min). Wenn die Reaktion nach 5 Minuten nicht gestoppt wurde, lesen Sie die Absorptionsgrade in Abständen von 2 Minuten weiter ab, bis die Absorptionsgrade über 2 min** hinweg konstant ansteigen.			

* Zum Beispiel mit einem Mikroplatten-Shaker, einer Schüttelfunktion auf einem Mikroplatten-Reader oder wiederholter Aspiration (z. B. mit einer Pipette, die auf ein Volumen von 50-100 µl eingestellt ist).

** Wenn diese „Kriechrate“ für die Probe größer ist als für die Blindprobe, die Absorptionsgrade der Probe zurück auf den Zeitpunkt der Zugabe von **Citrat-Lyase-Lösung** extrapoliieren.

BERECHNUNG (Mikroplatten-Assay-Verfahren):

$$\text{g/l} = \frac{\underline{\Delta A_{\text{Probe}}}}{\Delta A_{\text{Standard}}} \times \text{g/l Standard} \times F$$

Wurde die Probe während der Vorbereitung verdünnt, ist das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F zu multiplizieren.

PROBENVORBEREITUNG:

1. Probenverdünnung (für „manuelles Format“).

Die Menge an Zitronensäure in der Küvette (d. h. in den 0,20 ml der zu analysierenden Probe) sollte zwischen 1,0 und 100 µg liegen. Die Probenlösung muss daher so weit verdünnt werden, dass eine Konzentration zwischen 0,005 und 0,50 g/l erreicht wird.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Konzentration von Zitronensäure (g/l)	Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor (F)
< 0,50	Keine Verdünnung erforderlich	1
0,50-5,0	1 + 9	10
5,0-50	1 + 99	100
> 50	1 + 999	1000

Wenn der Wert von $\Delta A_{\text{Zitronensäure}}$ zu niedrig ist (z. B. < 0,100), mehr Probe abwiegen oder weniger stark verdünnen. Alternativ kann das Probenvolumen, das in die Küvette pipettiert werden soll, auf bis zu 1,70 ml erhöht werden, wobei sichergestellt wird, dass die Summe aus der Probe und dem destillierten Wasser in der Reaktion 1,70 ml beträgt, und das neue Probenvolumen in der Gleichung verwendet wird.

WICHTIGER HINWEIS: Die Benutzer sollten vor dem routinemäßigen Einsatz eine interne Matrixvalidierung durchführen. Dieses Verfahren weist auf problematische Matrizen hin. Im Folgenden finden Sie nur empfohlene Beispiele für die Probenvorbereitung.

2. Klärung der Probe:

Carrez-Reagenzien können nicht für die Deproteinisierung verwendet werden, da ihre Verwendung zu einer deutlich reduzierten Rückgewinnung führt. Als Alternative kommen Perchlор- oder Trichloressigsäure zum Einsatz (siehe konkrete Beispiele).

3. Allgemeine Überlegungen.

(a) **Flüssige Proben:** Klare, leicht gefärbte und annähernd neutrale, flüssige Proben können direkt im Assay verwendet werden.

(b) **Saure Proben:** Wenn > 0,2 ml einer sauren Probe unverdünnt verwendet werden sollen (z. B. Wein oder Fruchtsaft), sollte der pH-Wert der Lösung mit 2 M NaOH auf ca. 7,4 erhöht und die Lösung 30 min lang bei Raumtemperatur inkubiert werden.

(c) **Kohlendioxid:** Proben mit signifikantem Kohlendioxidegehalt, wie z. B. Bier, sollten durch Erhöhung des pH-Werts auf ca. 7,4 mit 2 M NaOH und leichtem Rühren oder durch Rühren mit einem Glasstab entgast werden.

(d) **Farbige Proben:** Bei farbigen Proben kann eine zusätzliche Blindprobe, d.h. eine Probe ohne CL, erforderlich sein.

- (e) Stark farbige Proben:** Bei unverdünnter Verwendung sollten stark farbige Proben durch Hinzugabe von 0,2 g Polyvinylpolypyrrrolidon (PVPP)/10 ml Probe behandelt werden. Die Tube 5 Minuten lang kräftig schütteln und durch einen Whatman No. 1 Papierfilter filtrieren.
- (f) Feste Proben:** Feste Proben in destilliertem Wasser homogenisieren oder zerstoßen und gegebenenfalls filtrieren.
- (g) Fetthaltige Proben:** Diese Proben mit heißem Wasser bei einer Temperatur über dem Schmelzpunkt des Fettes extrahieren, z. B. in einem 100-ml-Mischzyylinder bei 60 °C. Auf Raumtemperatur bringen und den Mischzyylinder bis zur Markierung mit Wasser füllen. 15-30 min auf Eis oder im Kühlschrank aufbewahren und dann filtrieren. Die ersten ml Filtrat entsorgen und den klaren Überstand (der leicht schillern könnte) für das Assay verwenden.
- (h) Proteinhaltige Proben:** Proteinhaltige Proben durch Zugabe eines gleichen Volumens eiskalter 1 M Perchlorsäure durch Mischen deproteinisieren. Bei 1.500 g 10 min lang zentrifugieren und den Überstand mit 1 M KOH neutralisieren. Alternativ kann Trichloressigsäure verwendet werden.

EMPFOHLENE BEISPIELE FÜR DIE PROBENVORBEREITUNG:

(a) Bestimmung der freien Zitronensäure in Wein.

Generell kann die Konzentration von freier [F]-Zitronensäure in Weiß- und Rotwein ohne Probenbehandlung bestimmt werden (abgesehen von Verdünnung gemäß Verdünnungstabelle). *In der Regel sind eine Verdünnung von 1:4 und ein Probenvolumen von 0,2 ml ausreichend.*

(b) Bestimmung der Zitronensäure und ihrer veresterten Derivate in Wein.

Die Konzentration sowohl von freier [F] als auch von veresterter [E] Zitronensäure [F + E] in Weiß- und Rotwein kann wie folgt bestimmt werden: 6 ml 2 M NaOH zu 20 ml Wein hinzugeben und unter Rückfluss 30 Minuten unter Rühren erhitzen. Nach dem Abkühlen den pH-Wert der Lösung vorsichtig mit 1 M H₂SO₄ auf 7,4 einstellen und das Volumen mit destilliertem Wasser auf 50 ml einstellen. Die Probe daraufhin gemäß dem allgemeinen Verfahren analysieren. Die erhaltene Konzentration ist die Summe aus der freien und der veresterten Zitronensäure [F + E], und somit kann die veresterte Zitronensäurekonzentration allein [E] wie folgt berechnet werden:

$$[E] = [F + E] - [F] \quad [\text{g/l}]$$

(c) Bestimmung der Zitronensäure in Bier.

Nach Entfernung von Kohlendioxid durch Rühren mit einem Glasstab wird die Probe gemäß der Verdünnungstabelle verdünnt und analysiert. **Hinweis:** Dunkle Biere enthalten wahrscheinlich freies Pyruvat, so dass zusätzliches NADH erforderlich sein kann. *In der Regel ist keine Verdünnung erforderlich und ein Probenvolumen von 0,2 ml ist ausreichend.*

(d) Bestimmung der Zitronensäure in Fruchtsäften, Erfrischungsgetränken, Tee und anderen Getränken.

Die Probe verdünnen, um eine Zitronensäurekonzentration von weniger als 0,50 g/l zu erhalten (siehe Verdünnungstabelle). Klare, neutrale Lösungen können in der Regel ohne Probenbehandlung (außer Verdünnung) bestimmt werden. Trübungen müssen in der Regel nur vor dem Verdünnungsschritt gefiltert werden. Farbige Lösungen eignen sich in der Regel nach Verdünnung auf eine geeignete Zitronensäurekonzentration für die Analyse. Wenn jedoch farbige Lösungen unverdünnt analysiert werden müssen, müssen sie möglicherweise wie folgt entfärbt werden: 25 ml der flüssigen Probe mit 1 M NaOH auf ca. pH 7,4 einstellen und das Volumen mit destilliertem Wasser auf 50 ml erhöhen. 0,5 g PVPP zugeben, 5 min rühren und durch einen Whatman No. 1 Papierfilter filtrieren. Das klare, leicht gefärbte Filtrat direkt im Assay verwenden. *In der Regel sind eine weitere Verdünnung von 1:20 und ein Probenvolumen von 0,2 ml ausreichend.*

(e) Bestimmung von Zitronensäure in Käse, Fleisch, Brot, Gemüse- und Obstprodukten.

Etwa 5 g repräsentatives Material genau in eine 100 ml Duran-Flasche® abwiegen. 20 ml 1 M Perchlorsäure zugeben und 2 Minuten lang mit einem Ultra-Turrax- oder Polytron-Homogenisator® (oder einem gleichwertigen Homogenisator) homogenisieren. Quantitativ in ein 40 ml Becherglas umfüllen und den pH-Wert mit 2 M KOH auf ca. 8,0 einstellen. Quantitativ in einen 100-ml-Mischzylinder übertragen und mit destilliertem Wasser auf die Markierung einstellen (wobei darauf zu achten ist, dass sich die fetthaltige Schicht „über“ der Markierung und die wässrige Schicht „an“ der Markierung befindet). 20 Minuten auf Eis lagern, um Kaliumperchlorat auszufällen und die Trennung des Fettes (falls vorhanden) zu ermöglichen. Filtrieren, die ersten 3 bis 5 ml entsorgen und das klare Filtrat für das Assay verwenden. *In der Regel ist keine weitere Verdünnung erforderlich und ein Probenvolumen von 0,2 ml ist ausreichend.*

(f) Bestimmung der Zitronensäure in Speiseölen, Margarinen und Salben.

Ca. 5 g repräsentatives Material genau in ein 200 ml Glasbecherglas einwiegen, 60 ml destilliertes Wasser zugeben und auf einem Heizplatten-Magnetrührer kräftig umrühren, bis es zum Kochen kommt. Die wässrige Phase wird mit einer Pipette in einen 100-ml-Mischzylinder überführt. Die Extraktion mit 30 ml destilliertem Wasser wiederholen. Die Temperatur des Mischzylinders auf 20-25 °C bringen und bis zur Markierung mit destilliertem Wasser auffüllen. Den Mischzylinder für 15 Minuten in ein Eisbad oder in den Kühlschrank stellen und ein Aliquot der Lösung durch einen Whatman No. 1 Papierfilter filtrieren. *In der Regel ist keine weitere Verdünnung erforderlich und ein Probenvolumen von 0,2 ml ist ausreichend.*

(g) Bestimmung der Zitronensäure in Papier.

Präzise etwa 2 g Papier in einen 100-ml-Mischzylinder abwiegen. Nach Zugabe von ca. 60 ml destilliertem Wasser den Inhalt ca. 1 Stunde lang bei Raumtemperatur kräftig umrühren (Magnetrührer). Den Magnetrührerstab entfernen und bis zur Markierung mit destilliertem Wasser auffüllen. Mischen und durch einen Whatman No. 1 Papierfilter filtrieren. Das klare Filtrat direkt im Assay verwenden. *In der Regel ist keine weitere Verdünnung erforderlich und ein Probenvolumen von 0,2 ml ist ausreichend.*

(h) Bestimmung der Zitronensäure in Hart- und Weichbonbons.

Ca. 3 g repräsentatives Material genau in einen 100-ml-Messkolben mit ca. 70 ml destilliertem Wasser abwiegen und bei 60 °C unter gelegentlichem Schütteln für 20 Minuten oder bis zur vollständigen Dispergierung erhitzen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur bis zur Markierung mit destilliertem Wasser auffüllen, mischen und durch einen Whatman No. 1 Papierfilter filtrieren. *In der Regel ist keine weitere Verdünnung erforderlich und ein Probenvolumen von 0,2 ml ist ausreichend.*

(i) Bestimmung von Zitronensäure in biologischen Gewebeproben.

Etwa 5 g repräsentatives biologisches Gewebe genau in eine 100 ml Duran-Flasche® abwiegen. 20 ml 1 M Perchlorsäure zugeben und 2 Minuten lang mit einem Ultra-Turrax- oder Polytron-Homogenisator® (oder einem gleichwertigen Homogenisator) homogenisieren.® Quantitativ in ein 40 ml Becherglas umfüllen und den pH-Wert mit 2 M KOH auf ca. 8,0 einstellen.

Quantitativ in einen 100-ml-Mischzylinder übertragen und mit destilliertem Wasser auf die Markierung einstellen (wobei darauf zu achten ist, dass sich die fetthaltige Schicht „über“ der Markierung und die wässrige Schicht „an“ der Markierung befindet). 20 Minuten auf Eis lagern, um Kaliumperchlorat auszufällen und die Trennung des Fettes (falls vorhanden) zu ermöglichen. Ein geeignetes Volumen der Probe bei 13.000 x g 10 Minuten lang zentrifugieren und den geklärten Überstand für die Verwendung im Assay rückgewinnen. Alternativ durch einen Whatman No. 1 Papierfilter filtrieren, die ersten 3-5 ml entsorgen und das klare Filtrat für den Assay verwenden. Falls erforderlich, die Probe für das Assay angemessen in destilliertem Wasser verdünnen.

Hinweis: Die Menge des verwendeten Ausgangsmaterials und die verwendeten Volumina können je nach Menge des in der Probe vorhandenen Analyten entsprechend angepasst werden.

(j) Bestimmung von Zitronensäure in biologischen Flüssigkeitsproben

(z.B. Urin und Serum).

Bei einigen biologischen Flüssigkeitsproben kann es ausreichend sein, sie direkt zu untersuchen, ohne dass die Probe abgesehen von der Verdünnung in destilliertem Wasser vorbereitet werden muss. Wenn dies nicht ausreicht, kann eine Deproteinisierung mit Perchlorsäure oder Trichloressigsäure erforderlich sein.

Biologische Proben durch Zugabe eines gleichen Volumens eiskalter 1 M Perchlorsäure durch Mischen deproteinisieren. Ein geeignetes Volumen der Probe bei 1.500 x g 10 Minuten lang zentrifugieren und den Überstand für die Verwendung im Assay rückgewinnen. Alternativ durch einen Whatman No. 1 Papierfilter filtrieren, die ersten 3-5 ml entsorgen und das Filtrat für den Assay verwenden. Falls erforderlich, die Probe für das Assay angemessen in destilliertem Wasser verdünnen. Alternativ können anstelle von Perchlorsäure 50% (w/v) Trichloressigsäure verwendet werden.

REFERENZ:

Mollering, H. (1989). Citrate. „*Methods of Enzymatic Analysis*“ (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol.VII, pp. 2-12, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, U



Kontaktieren Sie uns für weitere Informationen: neogen.com/contact

Ohne Gewähr

Die in diesem Assay-Protokoll enthaltenen Informationen sind nach bestem Wissen und Gewissen wahr und genau. Da die Verwendungsbedingungen jedoch außerhalb unserer Kontrolle liegen, besteht keine gewährte oder implizierte Gewährleistung hinsichtlich der abgegebenen Empfehlungen oder Vorschläge. Ebenso wird nicht gewährleistet, dass durch die Verwendung keine Patentverletzungen auftreten. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, vor dem routinemäßigen Einsatz eine interne Matrixvalidierung durchzuführen.