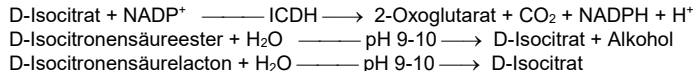


UV-Methode für ca. 32 Ansätze

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

Die Methode ist enthalten im deutschen, schweizerischen und spanischen Lebensmittelrecht. Empfohlen z.B. von IFU, AIJN. Standardisiert von DIN, EN, NF, NEN, GOST.

**Prinzip**



Ref.: 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

**Durchführung der Bestimmung**

- Wellenlänge: 340 nm (NADPH)  
ε = 6,3 l x mmol<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>
- Schichtdicke : 1,00 cm (Glas oder Plastikkuvette)
- Temperatur: +20 bis +25 °C
- Testvolumen: 3,050 ml
- Messung: gegen Luft oder Wasser
- Probelösung: 2 bis 100 µg D-Isocitronensäure in 0,100 bis 2,000 ml Probelösung

**Reagenzien**

- # 1 Ca. 33 ml Imidazol-Puffer, pH ca. 7,1 (Stabilität s. Packungsetikett). *Die Lösung ist gebrauchsfertig.*
- # 2 NADP, Lyophilisat, ca. 50 mg (Stabilität s. Packungsetikett). *Inhalt der Flasche # 2 mit dem gesamten Inhalt der Flasche # 1 lösen (= Lösung # 2). Die Lösung ist 1 Monat bei +2 bis +8 °C, bzw. 2 Monate bei -15 bis -25 °C stabil.*
- # 3: Ca. 1,8 ml Suspension Isocitrat Dehydrogenase (ICDH, ca. 10 U) in Ammoniumsulfat (Stabilität s. Packungsetikett). Die Suspension ist gebrauchsfertig. *Flasche vorsichtig schwenken bevor die Suspension pipettiert wird.*

Zusätzlich wird benötigt (nicht im Kit enthalten):  
Standard-Lösung D-Isocitronensäure, 0,5 g/l zur Testkontrolle.

Die Reagenzien zur Bestimmung von D-Isocitronensäure 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 <sup>1</sup>	Probe <sup>2</sup>	Ansatz Duplikat Probe <sup>3</sup>	Ansatz mit internem Standard <sup>4</sup>	Ansatz für Spuren-Analytik <sup>5</sup>
Imidazole Puffer mit NADP, Lösung # 2	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
<b>Probelösung<sup>6</sup></b> (z.B. 0,05 to 0,5 g D-Isocitronensäure/l)	-	-	<b>0,100 ml</b>	<b>0,200 ml</b>	<b>0,100 ml</b>	<b>2,000 ml</b>
Standard Lösung <sup>6</sup> (z.B. 0,5 g D-Isocitronensäure/l)	-	0,100 ml	-	-	0,100 ml	-
Bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	1,800 ml	1,800 ml	-
<b>Mischen<sup>7</sup>, nach ca. 3 min Extinktionen (E<sub>1</sub>) messen. Zugeben:</b>						
ICDH, Suspension # 3	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
<b>Mischen<sup>7</sup>, nach Ablauf der Reaktion (ca. 10 min) Extinktionen (E<sub>2</sub>) messen. Extinktionsmessungen nach weiteren 2 min wiederholen<sup>8</sup>.</b>						

**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 =  $[(\Delta E_{\text{Probe+Standard}} - \Delta E_{\text{Probe}}) / \Delta E_{\text{Standard}}] \times 100$  [%]
- 5 In der Spurenanalytik wird empfohlen, das Probevolumen bis zu 1,000 ml (0,001 bis 0,05 g D-Isocitronensäure/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).
- 8 Die Reaktion ist beendet, wenn die gemessene Extinktion konstant ist. Ist dies nicht der Fall, die Ansätze, die die Probelösung enthalten, weiter in Abständen von 2 min messen, bis die Extinktionszunahme konstant ist. Extinktionen auf die Zeit der Zugabe von ICDH (Suspension # 3) extrapolieren.



**Berechnung**

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

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

$$c = (3,050 \times 192,1 \times \Delta E) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,9300 \times \Delta E \text{ [g/l D-Isocitronensäure in der Probelösung]}}$$

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 eingewägt werden, wird das Ergebnis auf die Einwaage bezogen:

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

**Proben Vorbereitung**

1. *Klare, farblose, annähernd neutrale flüssige Proben* ggf. verdünnen, um eine Probelösung mit 0,05 bis 0,5 g D-Isocitronensäure/l zu erhalten.
2. *Trübe Lösungen* filtrieren oder zentrifugieren, ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
3. *Kohlensäurehaltige Proben*, z.B. durch Filtration entgasen, oder NaHCO<sub>3</sub> zugeben, bis die Lösung schwach alkalisch ist. Ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
4. *Saure (insbesondere leicht gefärbte) Lösungen* mit KOH oder NaOH auf pH 7 bis 7,5 einstellen, einige Minuten inkubieren, oder im Fall von farblosen Proben ohne pH-Einstellung verdünnen (s. Pkt. 1).
5. *"Gefärbte Proben"* (auf pH 8 eingestellt) gegen Probe-Leerwert messen.
6. *"Stark gefärbte Lösungen"*, die unverdünnt gemessen werden, mit PVPP oder Bentonit, z.B. 1 g/100 ml, behandeln, mischen, einige Minuten inkubieren, filtrieren.
7. *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).
8. *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.
9. *Vorbereitung der Probe nach Wallrauch*: 10 ml neutralisierten Fruchtsaft mit 5 ml NaOH (4 M) 10 min inkubieren. 5 ml HCl (4 M), 2 ml Ammoniak (25 %), 3 ml BaCl<sub>2</sub> (30 g/100 ml), 20 ml Aceton nacheinander zugeben. Mischen und 10 min inkubieren. 5 min zentrifugieren. Überstand abgessen, 20 ml Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (71 g/l) zugeben, Niederschlag mit einem Glasstab suspendieren, in siedendem Wasserbad 10 min unter Rühren erhitzen. Auf +20 to +25 °C bringen, in einen 50 ml-Messkolben überführen, bis zur Marke auffüllen mit Tris-Lösung (2,42 g/100 ml, mit HCl (1 M) auf pH 7,0 eingestellt; enthält 35 mg EDTA). In Erlenmeyer-Kolben, der 1 g Aktivkohle enthält, überführen, mischen, 5 min inkubieren, filtrieren. 1,000 ml Filtrat zum Test einsetzen.

**Test Eigenschaften**

1. *Spezifisch* für D-Isocitronensäure. Bei der Analyse von handelsüblichem Trinatrium-D,L-isocitrat-dihydrat (MG = 294,1) sind Ergebnisse von ca. 50 % zu erwarten (nur D-Isocitrat reagiert).
2. *Empfindlichkeit*: 0,25 mg/l (ΔE = 0,005; v = 1,000 ml; V = 3,050 ml)
3. *Nachweisgrenze*: 1 mg/l (ΔE = 0,020; v = 2,000 ml; V = 3,050 ml)
4. *Linearität*: 2 µg/Ansatz (v = 2,000 ml; V = 3,050 ml)  
bis 100 µg/Ansatz (v = 0,100 ml; V = 3,050 ml)
5. *Präzision*: ΔE = +/- 0,005 bis 0,010 Extinktionseinheiten  
VK = ca. 1 bis 2 %  
Fruchtsaft: r = 2,5 mg/l s(r) = +/- 0,8944 mg/l  
R = 4,4 mg/l s(R) = +/- 1,5665 mg/l
6. *Störungen*: Sulfid (> 30 µg/Ansatz) verursacht eine leichte Schleichreaktion durch Abbau von NADPH. Extinktionen E<sub>2</sub> auf den Zeitpunkt der Zugabe von ICDH (Suspension # 3) extrapolieren.
7. *Technischer Hinweis*. In der Fruchtsaft-Analytik wird meist die Probevorbereitung nach Wallrauch durchgeführt.