

UV-Test zur Bestimmung von Citronensäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
Test-Kombination für 50 Bestimmungen

Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 – 8 °C

Dieser Test wurde mit ausgewählten Proben der folgenden Matrices geprüft: Fruchtsaft, Erfrischungsgetränke, Wein, Tomatenketchup und Tomatenmark.

Detaillierte Ergebnisse und weitere Informationen zu den entsprechenden Validierungsdaten sind dem Validierungsbericht zu entnehmen.

Dieser Test wurde als AOAC *Official Method of Analysis*SM 2024.02 First Action zugelassen. Eine Publikation ist im J. AOAC Int. 108(1), 29–46 (2025) verfügbar.

Der Test kann auch mit anderen Lebensmitteln oder Probenmaterialien verwendet werden, sofern diese einer individuellen Validierung durch den Anwender unterzogen werden.

1. Testprinzip

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

Citronensäure —_{CL}→ Oxalacetat + Acetat

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

Oxalacetat + NADH + H⁺ —_{L-MDH}→ L-Malat + NAD⁺

Pyruvat + NADH + H⁺ —_{L-LDH}→ L-Lactat + NAD⁺

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 gemessen.

2. Reagenzien

2.1. Inhalt & Zusammensetzung

Der Test ist für eine manuelle und automatisierte Abarbeitung geeignet. Die Reagenzien reichen bei manueller Abarbeitung für 50 Bestimmungen. Die Anzahl der Bestimmungen bei automatisierter Abarbeitung ist um ein Vielfaches erhöht, jedoch geräteabhängig.

- Reagenz 1: 2 x 50 ml mit Puffer, NADH, L-MDH, L-LDH
- Reagenz 2: 2 x 12,5 ml mit Puffer, CL

2.2. Reagenzienvorbereitung

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig und müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 – 25 °C) gebracht werden. Komponenten nicht zwischen Kits verschiedener Chargen austauschen.

2.3. Lagerung & Haltbarkeit

Die Reagenzien sind bei sachgerechter Handhabung auch nach dem Öffnen bei 2 – 8 °C bis zur aufgedruckten Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren.

2.4. Sicherheit & Entsorgung

Der Test ist ausschließlich für den in der Zweckbestimmung beschriebenen Einsatz vorgesehen. Die Gebrauchsanweisung ist strikt zu befolgen.

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Chemikalien sind anzuwenden. Das Produkt darf nicht verschluckt werden. Berührung mit Haut und Schleimhäuten ist zu vermeiden.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten sind den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu entnehmen.

Nach Gebrauch sind die Reagenzien gemäß den geltenden Vorschriften als Laborabfall zu entsorgen. Das Verpackungsmaterial ist dem Recycling zuzuführen.

3. Probenvorbereitung

3.1. Allgemein

- Die Probenvorbereitung für die manuelle und die automatisierte Testdurchführung ist identisch.
- Proben vor der Messung auf Raumtemperatur bringen.
- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration im Messbereich (siehe Leistungsdaten) einsetzen.
- **Stark** saure oder alkalische Proben durch Zugabe von KOH/NaOH bzw. HCl neutralisieren (pH-Wert ca. 6,5 – 7,5).
- Trübe Proben (z.B. Säfte): die Testlösung durch einen geriffelten Papier- oder Spritzenfilter filtrieren oder in einem Reaktionsröhrchen zentrifugieren (3000 g für mindestens 5 Minuten), bis ein klares Filtrat / ein klarer Überstand entsteht.
- **Stark** gefärbte Proben, die unverdünnt gemessen werden (z.B. Säfte und Weine), bei Bedarf mit Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) entfärben. Z.B. 0,1 g PVPP auf 10 ml Probe, 1 Minute lang rühren und anschließend filtrieren, bis ein klarer Überstand vorliegt.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen, z.B. durch Rühren in einem Becherglas, Filtrieren oder Zentrifugieren.
- Feste und halb feste Proben zerkleinern, homogenisieren und mit Wasser extrahieren. Im Anschluss filtrieren oder zentrifugieren.
- Stark fetthaltige Proben in einen Messkolben einwiegen und mit heißem Wasser extrahieren; Probelösung zur Fettabscheidung abkühlen lassen (z.B. 15 Minuten im Eisbad); Messkolben bis zur Marke mit Wasser auffüllen und vor dem Testen filtrieren.
- Carrez-Klärung ist **ungeeignet**, da Citronensäure absorbiert wird!
- Zur Klärung proteinhaltiger Proben empfiehlt sich eine Aufarbeitung mit Perchlorsäure oder Trichloressigsäure.
- Bei höheren Probenvolumina (bis zu 1000 µl) den pH-Wert der Testlösung überprüfen und im Zweifelsfall neutralisieren.

3.2. Repräsentative Anwendungsbeispiele in Übereinstimmung mit der veröffentlichten AOAC-Methode und §64 52.01.01-5 LFGB

Hinweis: Die nachfolgend beschriebenen Empfehlungen zur Probenaufarbeitung entsprechen der veröffentlichten AOAC-Methode und §64 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren, Deutsches Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB). Alternativen können angewandt werden, sofern sie vom Anwender ordnungsgemäß validiert und verifiziert wurden.

3.2.1. Tomatenketchup

- Etwa 1 g der Probe (± 1 mg) genau in einen 100-ml-Becher einwiegen, etwa 25 ml destilliertes Wasser hinzufügen und etwa 10 Minuten lang auf einem Magnetrührer rühren.
- Anschließend die Suspension quantitativ in einen 50-ml-Messkolben überführen und mit Wasser auf 50 ml auffüllen.
- Den Inhalt mischen und durch einen Papierfilter filtern (die ersten 15 ml verwerfen) oder einen Spritzenfilter verwenden; alternativ die Lösung in einem Reaktionsröhrchen bei 3000 g mindestens 5 Minuten lang zentrifugieren, bis ein klarer Überstand vorliegt.

3.2.2. Tomatenmark

- Etwa 1 g der Probe (± 1 mg) genau in einen 100-ml-Becher einwiegen, etwa 25 ml destilliertes Wasser hinzufügen und etwa 10 Minuten lang auf einem Magnetrührer rühren.
- Anschließend die Suspension quantitativ in einen 100-ml-Messkolben überführen und mit Wasser auf 100 ml auffüllen.
- Den Inhalt mischen und durch einen Papierfilter filtern (die ersten 15 ml verwerfen) oder einen Spritzenfilter verwenden; alternativ die Lösung in einem Reaktionsröhrchen bei 3000 g mindestens 5 Minuten lang zentrifugieren, bis ein klarer Überstand vorliegt.

4. Manuelle Testdurchführung

Wellenlänge:	340 nm
Temperatur (Messung):	20 – 37 °C
Photometer-Abgleich:	gegen Luft (ohne Küvette)
Messbereich:	40 – 1000 mg/l (für 100 µl)

	Reagenzleerwert	Probe / Kontrolle
Reagenz 1	2000 µl	2000 µl
Probe / Kontrolle	-	100 µl
Dest. Wasser	100 µl	-
Mischen, 3 Minuten bei 20 – 37 °C inkubieren. Extinktion E₁ messen, dann Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, 15 Minuten bei 20 – 37 °C inkubieren und Extinktion E₂ messen.		

4.1 Wichtige Hinweise zur Testdurchführung

- Der Reagenzleerwert (Wasserprobe) **muss in jeder Messserie** mitbestimmt und von **jedem** Probenergebnis abgezogen werden.
- Die angegebenen Inkubationszeiten wurden bei 25 °C validiert und festgelegt. Die Durchführung des Tests ist grundsätzlich auch im Temperaturbereich von **20 – 37 °C** möglich.
- Verwenden Sie für jeden Probenextrakt und die Kontrolllösungen separate Spitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden; spülen Sie die Spitze vor dem Pipettieren.
- Für die Zugabe der Reagenzien wird die Verwendung einer Multistep-Pipette empfohlen. Verwenden Sie für jede Komponente eine separate Spitze.
- Zur Durchmischung empfiehlt sich die Verwendung von Rührspateln für jede einzelne Küvette. Diese erst unmittelbar vor den Extinktionsmessungen aus der Küvette nehmen.
- Das Ende der Reaktion bzw. ein Stillstand der Extinktionen sollte (zumindest bei den ersten Testdurchläufen bzw. der Validierung) stets abgewartet werden. Ist die Extinktion nach der empfohlenen Inkubationszeit nicht zum Stillstand gekommen, sollte weiter in bspw. 5-min-Abständen gemessen werden, bis ein konstanter Extinktionswert erreicht ist.
- Sollte eine Schleichreaktion auftreten, ist die Reaktion nach den angegebenen Inkubationszeiten noch nicht abgeschlossen und zeigt in der Regel einen konstanten Anstieg von ΔE. Berechnen Sie den analyt-spezifischen ΔE-Wert, indem Sie die Absorptionswerte gegen die Zeit auftragen und eine lineare Regression durchführen, um die Anstiegsrate von ΔE pro Minute in Relation zur Schleichreaktion zu bestimmen. Extrapolieren Sie dann die Absorption auf den Zeitpunkt der Reagenz-2-Zugabe.
- Ist die gemessene Extinktionsdifferenz der Proben zu klein (< 0,020), so ist die Probelösung mit höherer Einwaage oder weniger starker Verdünnung erneut herzustellen.
- Ist die Extinktionsdifferenz der Proben sehr groß (bspw. > 1,500), so ist die Probelösung gegebenenfalls zu verdünnen.

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probelösungen

5.1.1. Konzentration Citronensäure

Es gilt die Extinktionsdifferenz ΔE für jede Probe zu berechnen:

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)
RLW: Reagenzleerwert

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

Der angegebene df-Wert von **0,808** gilt für eine Basisapplikation von **100 µl**. Eine Erhöhung des Probenvolumens ist möglich (max. 1000 µl; siehe Validierungsbericht). Bei **gleichbleibenden Reagenzvolumina** erfordert dies die **Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors (df)**.

Bei Erhöhung des Probenvolumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es, dies **matrix-abhängig** zu überprüfen. **Der Reagenzleerwert ist dem veränderten Probenvolumen anzupassen.**

Die Berechnung der Citronensäure-Konzentration erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$C_{\text{Citronensäure}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(\epsilon \times d \times v \times 1000)} = 0,7929 \times \Delta E$$

Wurde der Probenextrakt vor der Messung verdünnt, muss dieses Ergebnis mit dem **Vorverdünnungsfaktor F** multipliziert werden.

V:	Testvolumen Basisapplikation [ml]	= 2,600
MG:	Molekulargewicht Citronensäure [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)

5.2. Berechnung bei Feststoffen

Bei der Analyse fester und halbfester Proben, die für die Extraktion der Probe eingewogen werden müssen, wird der Gehalt auf die Einwaage bezogen:

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir den Enzytec™ Liquid Multi-Acid Standard low (Art. Nr. E8460; mit 0,250 g/l Citronensäure).

Die Wiederfindung des Multi-Standards *low* sowie anderer *wässriger* Kontrolllösungen sollte bei 100 ± 5 % liegen.

Als zertifiziertes (Standard-)Referenzmaterial empfehlen wir:

- NIST Standard Reference Material 3282, *Low Calorie Cranberry Juice Cocktail*
- FAPAS Quality Control Material, Soft Drink (T03167QC)
- Standardwein der Deutschen Weinanalytiker*; z.B. Label "orange"; <https://www.weinanalytiker.de/standard-testloesung/>

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Der Test ist spezifisch für Citronensäure. Mehrere organische Säuren wurden bei einer Konzentration von 5,2 mmol/l (entspricht 1 g/l Citronensäure) in Abwesenheit von Citronensäure (Probenvolumen 100 µl) auf eine mögliche Nebenaktivität getestet: L-Ascorbinsäure, D-Weinsäure, D/L-Äpfelsäure, D/L-Isocitronensäure, L-Weinsäure, L- und D-Milchsäure, Essigsäure, Meso-Weinsäure und Oxalsäure. Keine dieser Substanzen zeigte bei diesen Konzentrationen Nebenaktivitäten.

6.2. Interferenzen

Es wurden Untersuchungen auf mögliche Interferenzen in Gegenwart von 0,5 g/l Citronensäure durchgeführt. Zu den getesteten Substanzen gehörten: D-Glucose, D-Fructose, Saccharose und Lactose, Cyclamat, Sucralose, Xylit, Saccharin, Acesulfam K, D-Sorbit, L-Ascorbinsäure, D- und L-Weinsäure, D- und L-Milchsäure, Sorbinsäure, Essigsäure und NaCl (jeweils 25 g/l). Diese Substanzen zeigten keinerlei Interferenz auf die Bestimmung von Citronensäure.

D-/L-Äpfelsäure (Summe aus beiden), meso-Weinsäure und SO₂ (als Na₂SO₃) wurden in verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 1,56 bis 25 g/l untersucht. Bei SO₂ und meso-Weinsäure wurde bei Konzentrationen von 3,13 g/l oder darunter keine Interferenz beobachtet. Die Summe aus D- und L-Äpfelsäure stört bei Konzentrationen von 25 g/l oder darunter nicht.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Linearität ist bis 1400 mg/l Citronensäure gegeben (100 µl Probe). Der empfohlene Messbereich beträgt 40 – 1000 mg/l.

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde nach der Methode DIN 32645:2008-11 in gepufferter wässriger Lösung ermittelt. Bei einem Probenvolumen von 100 µl beträgt die berechnete LoD 15 mg/l.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde mittels Präzisionsprofil ermittelt und beträgt 40 mg/l bei einem Probenvolumen von 100 µl.

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt $\Delta E = 0,005$. Für ein Probenvolumen von $v = 1000 \mu\text{l}$ ergibt sich ein errechnetes LoD von 0,53 mg/l. Auf Basis von $\Delta E = 0,010$ wurde ein LoQ von 1,06 mg/l errechnet.

6.4. Automatisierung mittels Pictus 500

6.4.1. Bestimmungsgrenze (LoQ)

P500 Applikation	LoQ
High Range	0,5 g/l
Basic Range	0,04 g/l
Sensitive Range	8 mg/l

6.4.2. Messbereiche

P500 Applikation	Messbereich
High Range	bis 5 g/l
Basic Range	bis 1 g/l
Sensitive Range	bis 100 mg/l

6.4.3. Präzision und Richtigkeit

Hier dargestellt sind Daten der Messung einer wässrigen Lösung.

High Range

Zielkonzentration, g/l	1,0	0,25
Mittelwert, g/l	0,989	0,248
SD g/l	0,0104	0,0048
RSD, %	1,05	1,93
Wiederfindung, %	98,9	99,1

Basic Range

Zielkonzentration, g/l	1	0,5	0,25
Mittelwert, g/l	1,012	0,494	0,252
SD g/l	0,0061	0,0027	0,0028
RSD, %	0,60	0,54	1,13
Wiederfindung, %	101,2	98,8	100,6

Sensitive Range

Zielkonzentration, g/l	0,1	0,05	0,025
Mittelwert, g/l	0,100	0,048	0,024
SD g/l	0,0009	0,0007	0,0012
RSD, %	0,94	1,54	5,17
Wiederfindung, %	100,0	95,8	95,2

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ Liquid Citric acid Validierungsbericht
- Enzytec™ Liquid Allgemeines Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid Citric acid Excel-Auswertevorlage
- Enzytec™ Liquid Citric acid Technical Information
- Enzytec™ Liquid Troubleshooting-Handbuch

Sicherheitsdatenblätter (SDS) und Analysenzertifikate (CoA) sind in digitaler Form und unter Angabe der Chargennummer über folgenden Link erhältlich:

<https://eifu.r-biopharm.com/>



8. Grenzen dieser Methode

Die Testergebnisse können in Abhängigkeit von der Probenmatrix, der individuellen Testdurchführung und den Umgebungsbedingungen im Labor variieren. Die Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen hängen von der jeweiligen Probenmatrix und dem Extraktionsverfahren ab. Detaillierte Informationen entnehmen Sie bitte dem aktuellen Validierungsbericht.

Für den vorliegenden Enzymtest wurden aufgrund der großen Anzahl von Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien nur angegebene, beispielhafte Matrices validiert.

Bei der Analyse einer nicht-validierten Matrix wird empfohlen, die erzielten Ergebnisse durch Dotierexperimente zu überprüfen. Falls erforderlich, ist eine geeignete Probenvorbereitung für die betreffende Probenmatrix zu entwickeln und ggf. zu validieren.

Die Verantwortung für die Validierung nicht geprüfter Matrices sowie für die Sicherstellung der Eignung des Tests für den vorgesehenen Zweck liegt ausschließlich beim Anwender.

9. Dienstleistungen & technischer Support

Auf Anfrage bieten wir Ihnen u.a. folgende Dienstleistungen:

- Kundenspezifisches Troubleshooting
- Workflowanalyse
- Daten- & Ergebnisanalyse
- Kunden-Workshops & Webinare
- Automatisierung: applikativer Support & technischer Service

10. Haftungsausschluss

Diese Angaben entsprechen dem aktuellen Stand unserer Kenntnisse und dienen ausschließlich der Information über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten. Sie stellen keine Zusicherung bestimmter Eigenschaften oder deren Eignung für einen konkreten Verwendungszweck dar.

R-Biopharm AG leistet für Sach- und Rechtsmängel über einen Zeitraum von 12 Monaten (bzw. im Falle von Produkten, die eine kürzere Haltbarkeit haben, bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums oder bei limitierter Verwendung bis zum Erreichen der Anzahl der Verwendungen) Gewähr, gerechnet vom Tag des Gefahrübergangs, vorbehaltlich einer frist- und formgerechten Rüge durch den Kunden, wobei die vereinbarte Beschaffenheit und Eignung für die vertraglich vorausgesetzte Verwendung und Übergabe mit vereinbartem Zubehör und vereinbarten Anleitungen („subjektiven Anforderungen“) entscheiden, ob eine Sache mangelhaft ist.

Die R-Biopharm AG übernimmt keine Gewährleistung für Folgen aus der Versäumnis

- Die Gebrauchs- oder Sicherheitsanweisungen eines Produktes zu lesen, zu verstehen oder zu befolgen;
- geschultes und qualifiziertes Personal für das Produkt einzusetzen;
- geeignete Industriestandards- und Praktiken anzuwenden, insbesondere Good Laboratory Practices;
- für das Produkt geeignete Kontroll-/Proben-/Probenmatrices oder Abarbeitungsverfahren/Prozesse einzusetzen und dies, soweit erforderlich, zu überprüfen;
- sonstige fehlerhafte Benutzung;
- Veränderung oder Bearbeitungen der Produkte
- unsachgemäße Lagerung durch den Kunden oder Dritte
- Folgen chemischer, elektromagnetischer, mechanischer oder elektrolytischer Einflüsse außerhalb der von R-Biopharm AG dokumentierten Standardbereiche
- Schäden und Störungen, die durch von R-Biopharm nicht zu vertretende äußere Einwirkungen entstanden sind (z.B. Einbruch, Diebstahl, Blitzschlag, Feuer, Wasser, höhere Gewalt).

R-Biopharm AG haftet für Arglist, grobe Fahrlässigkeit oder Vorsatz der R-Biopharm AG, Verletzung von Leib, Leben oder Gesundheit, der Übernahme einer Garantie, eines Beschaffungsrisikos nach § 276 BGB oder einer Haftung nach einem anderen gesetzlich zwingenden Haftungstatbestand.

Die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung wesentlicher Vertragspflichten (Pflichten, die für die Erreichung des Vertragszwecks wesentlich sind und auf deren Einhaltung der Vertragspartner regelmäßig vertrauen darf) ist auf den vertragstypisch vorhersehbaren Schaden begrenzt; die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung anderer Pflichtverletzungen ist ausgeschlossen.

ALLE WEITEREN AUSDRÜCKLICHEN ODER STILLSCHWEIGENDEN GEWÄHRLEISTUNGEN ODER GARANTIEN JEGLICHER ART SIND AUSGESCHLOSSEN, UNABHÄNGIG DAVON, OB SIE SICH AUS GEPFLOGENHEITEN, GESCHÄFTSPRAKTIKEN, DEM GESCHÄFTSVERLAUF ZWISCHEN DEN PARTEIEN ODER ANDEREN UMSTÄNDEN ERGEBEN.

Die R-Biopharm AG übernimmt keine Haftung für Folgeschäden, insbesondere entgangenen Gewinn, Produktionsrückstände oder sonstige mittelbare Schäden.