

UV-Test zur Bestimmung von D-threo-Isocitronensäure und deren Ester in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
Test-Kombination für 50 Bestimmungen

Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

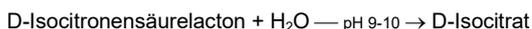
1. Testprinzip

In Gegenwart des Enzyms Isocitrat-Dehydrogenase (IC-DH) wird D-threo-Isocitronensäure (D-threo-Isocitrat) durch Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP) zu Oxoglutarat umgewandelt:



NADP wird dabei zu NADPH reduziert. Die bei dieser Reaktion gebildete Menge NADPH ist der umgesetzten Menge an D-threo-Isocitronensäure äquivalent und wird bei 340 nm vermessen.

Gebundene D-Isocitronensäure wird nach alkalischer Hydrolyse nach demselben Prinzip bestimmt.



2. Reagenzien

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, NADP
- Reagenz 2: 2 x 12,5 ml mit Puffer, IC-DH
- Assay Kontrolle: 1 x 2,0 ml mit D-threo-Isocitronensäure (0,05 g/l)

2.1. Reagenzienvorbereitung

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

2.2. Lagerung & Haltbarkeit

Die Reagenzien sind bei sachgerechter Handhabung auch nach dem Öffnen bei 2 - 8 °C bis zum Monatsende der angegebenen Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren.

2.3. Sicherheit & Entsorgung

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Chemikalien sind zu beachten. Nicht verschlucken sowie Berührung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten sind den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu entnehmen. Nach Gebrauch können die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgt und das Verpackungsmaterial dem Recycling zugeführt werden.

3. Probenvorbereitung

- Die Probenvorbereitung für die manuelle und die automatisierte Testdurchführung ist identisch.
- Die Proben sollten vor der Messung auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen mit dest. Wasser auf eine Konzentration innerhalb des Messbereichs (siehe Leistungsdaten) im Test einsetzen.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.

3.1. Bestimmung der freien D-threo-Isocitronensäure

Stark gefärbte Säfte, die unverdünnt eingesetzt werden: 25 ml Probe mit 2 M NaOH auf pH 7 - 7,5 neutralisieren, auf 50 ml auffüllen, 0,5 g PVPP zusetzen, anschließend filtrieren oder zentrifugieren.

3.2. Bestimmung von Gesamt-D-Isocitronensäure nach Wallrauch & Greiner

Die Bestimmung der D-Isocitronensäure und deren Ester in Säften und Nektaren kann auch gemäß der Methode nach Wallrauch und Greiner vorteilhaft ausgeführt werden. Für zuverlässige Messungen ist die Anwendung einer geeigneten Aktivkohle-Qualität erforderlich.

Reagenzien:

- Aceton, p. a.
- Ammoniak-Lösung, 25 %, p. a.
- Bariumchlorid, BaCl₂ × 2 H₂O, p. a.
- Natriumsulfat, p. a.
- Aktivkohle
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Tris
- Ethylendiamintetraacetat, EDTA-Na₂H₂ × 2 H₂O

Herstellung der Lösungen:

- Bariumchlorid-Lösung: 30 g BaCl₂ × 2 H₂O mit bidest. Wasser lösen und auf 100 ml auffüllen.
- Natriumsulfat-Lösung: 71 g Na₂SO₄ mit bidest. Wasser lösen und auf 1 l auffüllen.
- Tris-Pufferlösung, pH 7,0: 2,42 g Tris und 35 mg EDTA mit 80 ml bidest. Wasser lösen, mit Salzsäure (1 M) auf pH 7,0 einstellen und mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen.

Durchführung der Bestimmung (Fällungsmethode):

Im 100 ml Zentrifugenglas 10 ml Probelösung, ggf. nach Neutralisation, mit 5 ml Natronlauge (4 M) 10 min lang stehen lassen. Anschließend nacheinander 5 ml Salzsäure (4 M), 2 ml Ammoniak-Lösung (25 %), 3 ml BaCl₂-Lösung und 20 ml Aceton zugeben. Gründlich durchmischen und 10 min stehen lassen. Mischung 5 min zentrifugieren. Überstehende Flüssigkeit vorsichtig dekantieren, 20 ml Na₂SO₄-Lösung zum Niederschlag geben und Niederschlag im Zentrifugenglas mit einem Glasstab verrühren. Im siedenden Wasserbad 10 min lang unter häufigem Rühren erhitzen. Nach Abkühlen Inhalt des Zentrifugenglases quantitativ in einen 50 ml Messkolben überspülen und mit Tris-Pufferlösung bis zur Marke auffüllen. Inhalt des Messkolbens in einem Erlenmeyerkolben, in den vorher 1 g Aktivkohle eingewogen wurde, füllen und mischen, anschließend 5 min stehen lassen und filtrieren. Farblose, klare Lösung mit v = 1,000 ml zum Test einsetzen. Geändertes Probevolumen „v“ in der Berechnungsformel entsprechend berücksichtigen.

3.3. Vereinfachte Aufarbeitungsmethode zur Bestimmung von Gesamt-D-Isocitronensäure und deren Ester in Säften und Nektaren:

- 2,5 ml Probe + 1,25 ml 2 M NaOH, mischen, 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen.
- Anschließend 2,5 ml einer Tris-HCl-Lösung (2 M HCl-Lösung und 4 M Tris-Puffer-Lösung, pH 7,5, 1:1 mischen) zugeben und mischen.
- 5 min bei 4000 U/min (entspricht ca. 3450 x g) zentrifugieren.
- 100 µl des klaren Überstands im Test verwenden (Hinweis: bei der Auswertung den Verdünnungsfaktor von 2,5 berücksichtigen!).

4. Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
Temperatur: 20 - 37 °C (während der Messung)
Messung: gegen Luft (ohne Küvette) oder Wasser
Messbereich: 6 - 1500 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 ₁ messen, dann Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, 15 min bei 20 - 37 °C inkubieren und Extinktion E ₂ messen.		

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

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probelösungen

5.1.1. Gesamtkonzentration D-threo-Isocitronensäure

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

df: Dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)
RLW: Reagenzleerwert

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

Eine Erhöhung des Probenvolumens (bis max. 1000 µl) bei unveränderten Reagenzvolumina erfordert Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors (df). Bei Erhöhung des Volumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es dies Matrix-abhängig zu überprüfen.

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

V:	Testvolumen Basisapplikation [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)

5.2. Berechnung bei Feststoffen

$$\text{Gehalt}_{\text{D-threo-Isocitrat}} [\text{g}/100 \text{ g}] = \frac{C_{\text{D-threo-Isocitrat}} [\text{g/l Probelösung}]}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} [\text{g/l Probelösung}]} \times 100$$

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir die beiliegende D-threo-Isocitronensäure Assay Kontrolle.

Die Wiederfindung der Assay Kontrolle sollte innerhalb $100 \pm 5 \%$ liegen.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität, Nebenaktivitäten, Interferenzen

Der Test ist spezifisch für D-threo-Isocitronensäure und zeigt keine Nebenaktivitäten oder Interferenzen mit anderen relevanten Säuren. SO₂ stört bei Konzentrationen von unter 50 mg/l.

6.2. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Linearität ist bis 1900 mg/l D-threo-Isocitrat gegeben. Wird der empfohlene Messbereich von 6 bis 1500 mg/l (100 µl Probenvolumen) überschritten, sollten die Proben mit dest. Wasser auf eine Konzentration innerhalb des Messbereichs verdünnt werden. Der Verdünnungsfaktor ist bei der Berechnung zu berücksichtigen.

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 = 1,0 mg/l
LoQ = 6,0 mg/l
- Probenvolumen v = 1000 µl: LoD = 0,15 mg/l
LoQ = 0,40 mg/l

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ Liquid Validierungsberichte
- Enzytec™ Liquid Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid Excel-Auswertevorlagen
- Enzytec™ Liquid Troubleshooting-Handbuch

Sicherheitsdatenblätter (SDS) und Analysenzertifikate (CoA) sind in digitaler Form unter folgendem Link erhältlich

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



8. Dienstleistungen & technischer Support

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Leistungen:

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

9. 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.