

UV-Test zur Bestimmung von D-threo-Isocitronensäure und deren Ester in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien Nur für den Laborgebrauch
Test-Kombination für 50 Bestimmungen Lagerung bei 2 – 8 °C

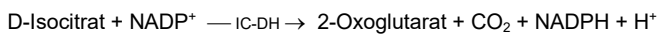
Dieser Test wurde mit ausgewählten Proben der folgenden Matrices geprüft: Obst- und Gemüsesäfte.

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

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

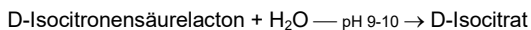
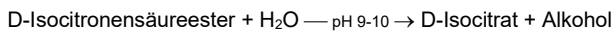
1. Testprinzip

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 gemessen.

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



Hinweis: Der Test Enzytec™ Liquid D-Isocitric acid ist speziell auf Ds-(+)-threo-Isocitronensäure ausgerichtet, das einzige natürlich vorkommende Isomer in Pflanzen und Tieren.

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

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. 7 – 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.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen, z.B. durch Rühren in einem Becherglas, Filtern oder Zentrifugieren.
- Feste und halb feste Proben zerkleinern, homogenisieren und mit Wasser extrahieren bzw. lösen. Bei Bedarf filtrieren.
- Stark fetthaltige Proben in einen Messkolben einwiegen und mit heißem Wasser extrahieren (Extraktionstemperatur über dem Schmelzpunkt des jeweiligen Fettes); zur Fettabscheidung abkühlen lassen; Messkolben bis zur Marke mit Wasser auffüllen, 15 Minuten in Eisbad stellen und vor dem Testen filtrieren.
- Bei höheren Probenvolumina (bis zu 1000 µl) den pH-Wert der Testlösung überprüfen und im Zweifelsfall neutralisieren.

3.2. Bestimmung der freien D-threo-Isocitronensäure in Säften und Weinen

- **Stark** gefärbte Säfte und Weine, die unverdünnt gemessen werden, bei Bedarf mit Polyvinylpyrrolidon (PVPP) entfärben.
- 25 ml Probe mit 2 M NaOH auf einen pH-Wert von etwa 7 – 7,5 neutralisieren und mit destilliertem Wasser auf 50 ml auffüllen.
- Lösung ca. 10 Minuten bei 20-25°C stehen lassen.
- 0,5 g PVPP zusetzen und 1 Minute lang einrühren, anschließend filtrieren oder zentrifugieren.
- Klare, gegebenenfalls leicht gefärbte Lösung im Test einsetzen.
- Stark saure Probelösungen, die unverdünnt zum Test eingesetzt werden, müssen vorher ggf. neutralisiert werden.

3.3. 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 & Greiner vorteilhaft ausgeführt werden. Für zuverlässige Messungen ist die Anwendung einer geeigneten Aktivkohle-Qualität erforderlich.

3.3.1. 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

3.3.2. Herstellung der Lösungen

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

3.3.3. Durchführung der Bestimmung (Fällungsmethode)

- 10 ml Probenlösung für 10 Minuten in einem 100-ml-Zentrifugenröhrchen stehenlassen, nachdem diese gegebenenfalls mit 5 ml 4 M NaOH-Lösung neutralisiert wurde.
- Nacheinander 5 ml HCl (4 M), 2 ml Ammoniaklösung (25 %), 3 ml BaCl₂-Lösung und 20 ml Aceton hinzufügen. Gründlich mischen und die Lösung 10 Minuten stehen lassen.
- Die Mischung 5 Minuten lang zentrifugieren. Den Überstand vorsichtig abgießen und 20 ml Natriumsulfatlösung zum Niederschlag im Zentrifugenröhrchen geben. Den Niederschlag mit einem Glasstab umrühren.
- Unter stetigem Rühren 10 Minuten lang in einem kochenden Wasserbad erhitzen.
- Die Lösung abkühlen lassen, den Inhalt quantitativ in einen 50-ml-Messkolben überführen und bis zur Marke mit Tris-Pufferlösung auffüllen.
- Den Inhalt des Messkolbens in einen Erlenmeyerkolben mit 1 g Aktivkohle überführen, mischen, 5 Minuten stehen lassen und filtrieren.
- Die farblose, klare Lösung mit einem Volumen von v = 1000 µl für den Test verwenden (Änderung in der Formel berücksichtigen).

3.4. 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 und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen.
- 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 Minuten bei 4000 U/min (entspricht ca. 3450 g) zentrifugieren.
- 100 µl des klaren Überstands im Test verwenden.
- Bei Auswertung den Verdünnungsfaktor von 2,5 berücksichtigen.

4. Manuelle Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
 Temperatur (Messung): 20 – 37 °C
 Photometer-Abgleich: gegen Luft (ohne Küvette)
 Messbereich: 6 – 1500 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 37 °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 Multistepper-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-Minuten-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. Gesamtkonzentration D-threo-Isocitronensäure

Es gilt die Extinktionsdifferenz ΔE für jede Probe zu berechnen:

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

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 Reagenzvolamina 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 D-threo-Isocitronensäure-Konzentration erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

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

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

V: Testvolumen Basisapplikation [ml] = 2,600
 MG: Molekulargewicht Isocitronensäure [g/mol] = 192,13
 d: Schichtdicke [cm] = 1,00
 v: Probenvolumen [ml] = 0,100
 ε: Extinktionskoeffizient NADPH [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:

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Hierfür empfehlen wir die beiliegende Test-Kontrolllösung mit 0,050 g/l D-threo-Isocitronensäure.

Die Wiederfindung dieses Standards 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*

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Das Enzym Isocitrat-Dehydrogenase katalysiert spezifisch die Oxidation von D-threo-Isocitrat. Der Test zeigt keine Nebenaktivitäten zu anderen relevanten Säuren.

6.2. Interferenzen

Es wurde eine Interferenzstudie in Gegenwart von 0,5 g/l Isocitronensäure und gleichen Volumina der untersuchten Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Zu den getesteten Substanzen gehörten: L-Äpfelsäure und Citronensäure (jeweils 75 g/l), Glyoxylat, Succinat, 2-Oxoglutarat (jeweils 12,5 g/l), L-Ascorbinsäure, D-Fructose, D-Glucose, D-Galactose, Lactose, Maltose und Saccharose (jeweils 10 g/l) sowie Glycerin (1 g/l). Alle Substanzen haben keinen interferierenden Einfluss auf die Bestimmung von Isocitronensäure.

Schwefeldioxid (SO₂) – sofern in einem Obst- oder Gemüsesaft enthalten – beeinträchtigt das System und zeigte bei hohen Konzentrationen zwischen 1,25 und 10 g/l in Gegenwart von 0,5 g/l Isocitronensäure einen Einfluss auf die E1-Messung.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Linearität ist bis 1900 mg/l D-threo-Isocitrat gegeben (100 µl Probe). Der empfohlene Messbereich beträgt 6 – 1500 mg/l.

Wird der empfohlene Messbereich überschritten, sollten die Proben mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration innerhalb des Messbereichs verdünnt werden. Der Verdünnungsfaktor F 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 D-Isocitric acid Validierungsbericht
- Enzytec™ Liquid Allgemeines Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid D-Isocitric acid Excel-Auswertevorlage
- Enzytec™ Liquid D-Isocitric 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 GARANTIEEN JEDLICHER 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.