

Enzymatische UV-Bestimmung von D-threo-Isocitronensäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
2 x 50 mL R1 und 2 x 12,5 mL R2 – 50 Tests (manuell) / ≥ 500 Tests (Auto-Analysegerät)

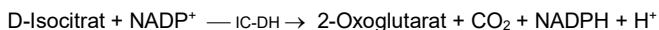
Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

Methode

Enzymatische UV-Bestimmung von D-threo-Isocitronensäure mit Isocitrat-Dehydrogenase (IC-DH).

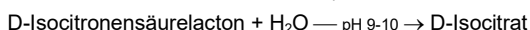
Testprinzip

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.



Reagenzien

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig.

- Reagenz 1: 2 x 50 mL (Puffer, NADP)
- Reagenz 2: 2 x 12,5 mL (Puffer, IC-DH)

Die Reagenzien sind bei 2 - 8 °C bis zum Monatsende der Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren. Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Chemikalien sollten beachtet werden. Nicht verschlucken! Berührung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten sind den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (MSDS) auf unserer Internetseite (www.r-biopharm.de) zu entnehmen. Nach Gebrauch die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgen. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

Probenvorbereitung

- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen in den Messbereich im Test einsetzen.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen.
- Feste Proben zerkleinern und homogenisieren, geeignete Probemenge einwiegen und mit Wasser extrahieren.
- Stark gefärbten Säften oder Weinen, 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.
- Detaillierter Probenaufarbeitungsleitfaden auf Anfrage erhältlich.

Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm
Temperatur: 37 °C oder 20 - 25 °C
Messung: gegen Luft oder Wasser
Proben: 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 37 °C oder bei 20 - 25 °C inkubieren. Extinktion E ₁ messen, dann zugeben:		
Reagenz 2	500 µL	500 µL
Mischen, das Ende der Reaktion abwarten (15 min bei 37 °C oder bei 20 - 25 °C inkubieren) und Extinktion E ₂ messen.		

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

Berechnung der Ergebnisse

Berechnung bei Probelösungen:

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

df: dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)

RLW: Reagenzleerwert

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

Eine Erhöhung des Probenvolumens (bis 1000 µL) bei unveränderten Reagenzvolumina erfordert Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors.

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

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)

Hieraus ergibt sich für eine Messung bei 340 nm:

$$C_{D\text{-threo-Isocitrat}} [\text{g/L}] = 0,7929 \times \Delta E$$

Berechnung bei Feststoffen:

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

Leistungsdaten

Spezifität

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.

Linearität & Messbereich

Linearität ist bis 1900 mg/L D-threo-Isocitrat gegeben. Wird der empfohlene Messbereich von 6 bis 1500 mg/L überschritten, sollten die Proben mit dest. Wasser auf eine Konzentration innerhalb des Messbereichs verdünnt werden.

Der Verdünnungsfaktor ist bei der Berechnung zu berücksichtigen.

Sensitivität

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

Automatisierung & Validierungsberichte

Applikationsempfehlungen für Auto-Analysegeräte und Kundenvalidierungsberichte sind auf Anfrage erhältlich.

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.