

# Citronensäure

## UV-Test

zur Bestimmung von Citronensäure in Lebensmitteln und anderen Probematerialien

**Best. Nr. 10 139 076 035**

Test-Combination für 3 × 12 Bestimmungen

**BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM**  
Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik

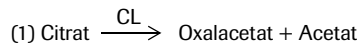
Nur zur Verwendung in der Lebensmittelhygiene.

**Lagern bei 2-8°C**

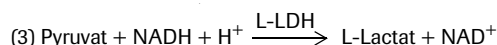
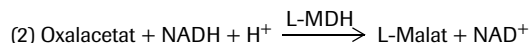
Methoden-Empfehlungen und standardisierte Verfahren siehe unter Literatur (2)

### Prinzip (Lit. 1)

Citronensäure (Citrat) wird in der durch das Enzym Citrat-Lyase (CL) katalysierten Reaktion in Oxalacetat und Acetat überführt (1).



In Gegenwart der Enzyme L-Malat-Dehydrogenase (L-MDH) und L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH) werden Oxalacetat und dessen Decarboxylierungs-Produkt Pyruvat durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) zu L-Malat bzw. L-Lactat reduziert (2, 3).



Die Summe der während der Reaktionen (2) und (3) verbrauchten NADH-Mengen ist der Citrat-Menge äquivalent. NADH ist Messgröße und wird aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm bestimmt.

**(Hinweis: Durch die Reihenfolge der Reagenzzugabe ist sichergestellt, dass freies Pyruvat nicht erfasst wird.)**

### Die Test-Combination enthält

- Drei Flaschen 1 mit je ca. 1,4 g Lyophilisat, zusammengesetzt aus: Glycylglycinpuffer, pH ca. 7,8; L-Malat-Dehydrogenase, ca. 136 U; L-Lactat-Dehydrogenase, ca. 280 U; NADH, ca. 5 mg
- Drei Flaschen 2 mit je ca. 50 mg Lyophilisat Citrat-Lyase, ca. 12 U
- Flasche 3 mit Citronensäure-Testkontroll-Lösung zur Testkontrolle (Die Messung der Testkontroll-Lösung ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen.) Testkontroll-Lösung unverdünnt verwenden. (Verwendbar bis: s. Packungsetikett).

### Herstellung der Lösungen für 10 Bestimmungen

- Inhalt einer Flasche 1 mit 12 ml bidest. Wasser lösen.
- Inhalt einer Flasche 2 mit 0,3 ml bidest. Wasser lösen.

### Stabilität der Reagenzien

Der Inhalt der Flaschen 1 und 2 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).  
Lösung 1 ist bei 2-8°C 2 Wochen, bei -20 bis -25°C 4 Wochen haltbar.  
Lösung 1 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.  
Lösung 2 ist bei 2-8°C 1 Woche, bei -20 bis -25°C 4 Wochen haltbar.

### Bestimmungsansatz

Wellenlänge<sup>1</sup>: 340 nm, Hg 365 nm oder Hg 334 nm  
Glasküvette<sup>2</sup>: 1,00 cm Schichtdicke  
Temperatur: 20-25°C  
Testvolumen: 3,020 ml  
Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette) oder gegen Wasser  
Probelösung: 1-80 µg Citronensäure/Testansatz<sup>3</sup> (in 0,200-2,000 ml Probevolumen)

| In Küvetten pipettieren   | Leerwert | Probe    |
|---|----------|----------|
| Lösung 1  | 1,000 ml | 1,000 ml |
| Probelösung*  | -        | 0,200 ml |
| bidest. Wasser  | 2,000 ml | 1,800 ml |
| mischen**, nach ca. 5 min Extinktionen der Lösungen messen (E <sub>1</sub> ), Reaktion starten durch Zugabe von |          |          |
| Lösung 2  | 0,020 ml | 0,020 ml |
| mischen**, nach Ablauf der Reaktion (ca. 5 min) Extinktionen der Lösungen messen (E <sub>2</sub> ),             |          |          |

\* Vor der Dosierung der Probelösung Enzymtest-Messpipette bzw. Pipettenspitze der Kolbenhubpipette mit der Probelösung vorspülen.

\*\* Z. B. mit Rührspatel oder durch Umschwenken nach Verschliessen z. B. mit Parafilm (Warenzeichen der American Can Company, Greenwich, Ct., USA)

Für Leerwert und Probe Extinktionsdifferenzen (E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub>) berechnen. Extinktionsdifferenz des Leerwertes von Extinktionsdifferenz der Probe abziehen.

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

Gelegentlich resultiert bei (E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub>)<sub>Leerwert</sub> ein negativer Wert. Dieser Wert muss dann entsprechend dem Berechnungsschema zu (E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub>)<sub>Probe</sub> addiert werden.

Die gemessene Extinktionsdifferenz sollte zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Extinktionseinheiten betragen (s. "Hinweise zur Testdurchführung" und "Empfindlichkeit und Nachweisgrenze", Pkt. 4).

Ist die Extinktionsdifferenz der Probe (ΔE<sub>Probe</sub>) grösser als 1,000 (gemessen bei 340, bzw. Hg 334 nm) bzw. 0,500 (gemessen bei Hg 365 nm), so ist die Konzentration der Citronensäure in der Probelösung zu hoch. Die Probelösung ist dann gemäss Verdünnungstabelle zu verdünnen.

### Berechnung

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

$$c = \frac{V \times MG}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E \text{ [g/l]}$$

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient von NADH bei:  
340 nm = 6,3 [l × mmol<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>]  
Hg 365 nm = 3,4 [l × mmol<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>]  
Hg 334 nm = 6,18 [l × mmol<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>]

Hieraus ergibt sich für Citronensäure (als wasserfreie Säure berechnet):

$$c = \frac{3,020 \times 192,1}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,200 \times 1000} \times \Delta E = \frac{2,900}{\varepsilon} \times \Delta E \text{ [g Citronensäure/l Probelösung]}$$

für Citronensäure (als Monohydrat berechnet):

$$c = \frac{3,020 \times 210,1}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,200 \times 1000} \times \Delta E = \frac{3,173}{\varepsilon} \times \Delta E \text{ [g Citronensäure} \times \text{H}_2\text{O/l Probelösung]}$$

Ist bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen worden, muss das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert werden.

Bei der Analyse fester und halbfester Proben, die für die Vorbereitung der Probe eingewägt werden, wird das Analysenergebnis auf die Einwaage bezogen:

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

### 1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Citronensäuremenge zwischen 1 µg und 80 µg betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit zu verdünnen, dass die Citronensäure-Konzentration zwischen 0,04 und 0,4 g/l liegt.

- Das Absorptionsmaximum von NADH liegt bei 340 nm. Bei Verwendung von Spektrophotometern wird im Absorptionsmaximum, bei Verwendung von Spektral-Linienphotometern mit Hg-Dampflampe wird bei einer Messstrahlung von 365 nm oder 334 nm gemessen.
- Anstelle von Glasküvetten sind ggf. auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.
- Siehe Hinweise zur Testdurchführung
- Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid, NADH-Na<sub>2</sub>, Best.-Nr. 127 345, zu beziehen von Roche Applied Science

## Verdünnungstabelle

| Geschätzte Menge an Citrat im Liter | Verdünnung mit Wasser | Verdünnungsfaktor F |
|-------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| < 0,4 g                             | -                     | 1                   |
| 0,4-4,0 g                           | 1 + 9                 | 10                  |
| 4,0-40 g                            | 1 + 99                | 100                 |
| > 40 g                              | 1 + 999               | 1000                |

Ist die gemessene Extinktionsdifferenz ( $\Delta E$ ) zu klein (z.B.  $< 0,100$ ), so ist die Probelösung erneut herzustellen (höhere Einwaage oder weniger starke Verdünnung), oder das in die Küvette zu pipettierende Probevolumen ( $v$ ) ist bis auf 2,000 ml zu erhöhen. In diesem Fall ist das Volumen der hinzuzufügenden Wassermenge entsprechend zu verringern, so dass in den Ansätzen für Probe und Leerwert das gleiche Testvolumen vorliegt. Das geänderte Probevolumen  $v$  ist in der Berechnungsformel entsprechend zu berücksichtigen.

## 2. Technische Hinweise

2.1 Bei der Berechnung ist eindeutig anzugeben, ob die Ergebnisse als Citronensäure (Molmasse 192,1 g/Mol), Citronensäure-monohydrat (Molmasse 210,1 g/Mol) oder als Citrat (Molmasse 189,1 g/Mol) angegeben werden. (Bei der enzymatischen Bestimmung wird das Citrat-Ion gemessen.)

2.2 Beim Beurteilen von Analyseergebnissen ist zu berücksichtigen, dass bei der acidimetrischen Bestimmung der "Gesamtsäure berechnet als Citronensäure" Protonen gemessen werden und bei der enzymatischen Bestimmung das Citrat-Ion. Ein direkter Vergleich der Zahlenwerte ist somit nicht möglich.

## 3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

Die Bestimmung ist spezifisch für Citronensäure.

Bei der Analyse der Reinsubstanz Citronensäure-monohydrat können Ergebnisse von höher als 100% erhalten werden wenn bei der Lagerung ein Verlust an Kristallwasser auftritt und die Ergebnisse mit der Molmasse (210,1) von Citronensäure-monohydrat berechnet werden.

## 4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze (Lit. 1.4)

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen  $v = 2,000$  ml und Messung bei 340 nm einer Konzentration an Citronensäure von 0,25 mg/l (bei 0,200 ml entsprechend 2,5 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von 0,5 mg/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,010 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probevolumen  $v = 2,000$  ml.

## 5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von 1  $\mu$ g Citronensäure/Ansatz (0,5 mg Citronensäure/l Probelösung; Probevolumen  $v = 2,000$  ml) bis 80  $\mu$ g Citronensäure/Ansatz (0,4 g Citronensäure/l Probelösung; Probevolumen  $v = 0,200$  ml).

## 6. Präzision

Bei einer Doppelbestimmung, ausgehend von einer Probelösung, ist mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,005 bis 0,010 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probevolumen  $v = 0,200$  ml einer Citronensäure-Konzentration von ca. 3-5 mg/l. (Ist bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen worden, ist mit dem Verdünnungsfaktor F zu multiplizieren. Bei einer Einwaage von 1 g Probe/100 ml = 10 g/l sind die zu erwartenden Unterschiede ca. 0,03-0,05 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten veröffentlicht:

VK = 4,4 %  $n = 10$  Kaninchenleber-Extrakt  
VK = 1,3 %  $n = 10$  Wein (Lit. 1.3)

Fruchtsaft:

$$r = 0,095 + 0,025 \times (C_{\text{Citronensäure}} \text{ in g/l}) \text{ g/l}$$
$$R = 0,13 + 0,054 \times (C_{\text{Citronensäure}} \text{ in g/l}) \text{ g/l}$$

Weitere Daten: s. Literatur (Lit. 2.3)

Wein:

Citronensäure  $< 400$  mg/l: Citronensäure  $> 400$  mg/l:  
 $r = 14$  mg/l  $R = 39$  mg/l  $r = 28$  mg/l  $R = 65$  mg/l (Lit. 2.13, 2.14)

## 7. Störungen

Enthält die Probelösung freie Brenztraubensäure, so wird bereits vor der Messung von  $E_1$  NADH verbraucht. In diesem Fall wird empfohlen, NADH dem Test zusätzlich zuzusetzen (z.B. 0,1 ml NADH-Lösung, 5 mg/ml)<sup>4</sup> und entsprechend weniger bidest. Wasser zu verwenden.

## 8. Erkennen von Störungen

8.1 Ist die Umsetzung von Citronensäure nach der unter "Bestimmungsansatz" angegebenen Zeit beendet, so kann im allgemeinen auf einen störungsfreien Ablauf geschlossen werden.

8.2 Nach Ablauf der Reaktion kann durch Zugabe von Citronensäure oder Natrium-citrat (qualitativ oder quantitativ) die Reaktion wieder gestartet werden: Die erneute Änderung der Extinktion nach Zugabe des Standardmaterials ist ein Beweis für den störungsfreien Ablauf der Bestimmung.

8.3 Grobe Fehler beim Testansatz und Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können auch erkannt werden, wenn aus einer Probelösung eine Doppelbestimmung mit verschiedenen Probevolumina (z. B. 0,100 ml und 0,200 ml) ausgeführt wird: Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein.

Bei der Analytik fester Proben wird die Einwägung verschiedener Mengen (z. B. 1 g und 2 g) in 100 ml-Messkolben empfohlen. Bei gleichen Probevolumina für die Testansätze muss Proportionalität zwischen Extinktionsdifferenz und Einwaage gegeben sein.

8.4 Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können weiterhin durch Mitführen eines internen Standards erkannt werden: Neben Probe-, Leerwert- und Standardansatz wird ein weiterer Ansatz mit Probe- und Testkontroll-Lösung analysiert. Aus den ermittelten Extinktionsdifferenzen wird die Wiederfindung berechnet.

8.5 Verluste während der Vorbereitung der Probe können durch Wiederfindungsversuche erkannt werden: Die Probe wird mit und ohne zugesetztem Standardmaterial vorbereitet und anschließend gemessen. Der Zusatz muss (innerhalb des Analysenfehlers) quantitativ wiedergefunden werden.

## 9. Gefährlichkeit der Reagenzien

Die Reagenzien zur Bestimmung von Citronensäure enthalten gefährliche Stoffe oder Zubereitungen im Sinne der Gefahrstoffverordnung, des Chemikaliengesetzes oder der EG-Richtlinien 67/548 und 99/45 und deren Änderungs- und Anpassungsrichtlinien. Weitere Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern und auf dem Etikett der betroffenen Flaschen.

## 10. Allgemeine Hinweise zur Vorbereitung der Proben

**Flüssige, klare, farblose und annähernd neutrale Proben** direkt, nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle oder mit einem Probevolumen bis 2,000 ml zum Test einsetzen;

**Trübe Lösungen** filtrieren;

**Kohlensäure-haltige Proben** (z.B. durch Filtration) entgasen;

**saure Proben** mit Kalilauge oder Natronlauge auf ca. pH 8 einstellen;

**saure und schwach gefärbte Proben** mit Kalilauge oder Natronlauge auf ca. pH 8 einstellen und ca. 15 min stehen lassen;

**stark gefärbte Proben**, die unverdünnt oder mit einem höheren Probevolumen zum Test eingesetzt werden, mit Polyvinylpyrrolidon (PVPP) oder Polyamid (z.B. 1 g/100 ml) behandeln;

**feste und halb feste Proben** zerkleinern oder homogenisieren, mit Wasser extrahieren bzw. lösen, wenn nötig filtrieren;

**Protein-haltige Proben** mit Perchlorsäure enteiuweissen;

**Fett-haltige Proben** mit heissem Wasser extrahieren (Extraktionstemperatur über dem Schmelzpunkt des jeweiligen Fettes), zur Abscheidung des Fettes abkühlen lassen, Messkolben bis zur Marke auffüllen, 15 min in Eisbad stellen und filtrieren.

## Wichtiger Hinweis

**Die Carrez-Klärung kann bei der Vorbereitung der Probe zur Citronensäure-Bestimmung wegen zu geringer Wiederfindungsrate nicht angewendet werden (Adsorption von Citronensäure).**

Soll neben freier Citronensäure auch veresterte Citronensäure bestimmt werden – z. B. Citronensäureester von Polyphenolen oder Anthocyanen – so müssen die Ester durch alkalische Hydrolyse in die freie Säure überführt werden. Man verfährt wie unter "Wein" angegeben.

## 11. Anwendungsbeispiele

### Bestimmung von Citronensäure in Fruchtsäften, Erfrischungsgetränken, Tee und ähnlichen Getränken

Trübungen mittels Filtration entfernen; Probe soweit verdünnen, dass die Citronensäure-Konzentration zwischen 0,04 und 0,4 g/l beträgt. Die verdünnte Lösung kann zum Test eingesetzt werden, auch wenn diese gefärbt ist. Nur *stark gefärbte* Säfte müssen entfärbt werden, wenn sie aufgrund ihrer geringen Citronensäure-Konzentration unverdünnt eingesetzt werden. In diesem Fall wird wie folgt verfahren:

10 ml Saft und 0,1 g Polyamid oder Polyvinylpyrrolidon (PVPP) mischen, 1 min rühren und filtrieren. Klare, leicht gefärbte Lösung zum Test einsetzen, ggf. neutralisieren.

### Bestimmung von Citronensäure in Wein

Leicht gefärbte Weine direkt oder nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle zum Test einsetzen. Stark gefärbte Weine müssen entfärbt werden, wenn sie aufgrund ihrer geringen Citronensäure-Konzentration unverdünnt oder mit einem höheren Probevolumen zum Test eingesetzt werden:

10 ml Wein und 0,1 g Polyamid oder Polyvinylpyrrolidon (PVPP) mischen, 1 min rühren und filtrieren. Leicht gefärbte Lösung zum Test einsetzen.

### Bestimmung von Citronensäure-Estern in Wein

20 ml Probe mit 6 ml alkoholischer Kalilauge (ca. 2 M; Methanol oder Ethanol) 10 min lang am Rückflusskühler unter Rühren erhitzen, auf 20-25°C abkühlen und mit Schwefelsäure (2 M) neutralisieren. Quantitativ in ein 50 ml-Messkölbchen überführen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Probe direkt bzw. nach Verdünnen zum Test einsetzen (ergibt Gesamt-Citronensäure = Summe von freier und veresteter Citronensäure).

### Bestimmung von Citronensäure in Bier

Etwa 5-10 ml Bier filtrieren oder zur Entfernung der Kohlensäure etwa 1 min lang mit einem Rührstab rühren. Die weitgehend CO<sub>2</sub>-freie Bierprobe wird ohne weitere Verdünnung zum Test eingesetzt.

### Bestimmung von Citronensäure in Brot, Fleisch-Erzeugnissen, Käse, Gemüse- und Obstprodukten

Ca. 20-50 g Probematerial zerkleinern (z.B. Mörser, Fleischwolf oder Homogenisator). Ca. 10 g der gut gemischten Probe in einem Homogenisierbecher genau einwiegen und mit 50 ml Perchlorsäure (1 M) versetzen; 2 min (bis zu 10 min) mit dem Homogenisator homogenisieren. Eine hierbei auftretende Erwärmung ist bis zu 35°C zulässig. Homogenat zentrifugieren.

20 ml Überstand mit ca. 4 ml Kalilauge (5 M) auf pH 8-10 einstellen (das Volumen der zur Neutralisation benötigten KOH messen). Lösung zur quantitativen Fällung des gebildeten Kaliumperchlorats 15 min in den Kühlschrank stellen, filtrieren, die ersten ml verwerfen. Filtrat, ggf. nach Verdünnen, gemäss Verdünnungstabelle zum Test einsetzen.

Zur Berechnung des Gehalts (in g/100 g) nach der unter "Berechnung" angegebenen Formel wird die Konzentration der Probe in der Probelösung benötigt. Bei Anwendung der oben beschriebenen Vorbereitung der Probe und unter Berücksichtigung des Wassergehaltes der Probe berechnet sich die Einwaage der Probe nach:

$$\text{Einwaage}_{\text{Probe}} = \frac{a \times 1000 \times d}{(b + a \times w) \times (d + e)} \quad [\text{g/l Probelösung}]$$

Hierbei sind:

- a: Einwaage der Probe in g
- b: Volumen Perchlorsäure in ml
- d: Volumen Überstand für pH-Einstellung in ml
- e: Volumen KOH zur Einstellung auf pH 8-10 in ml
- w: Wasseranteil der Probe in (%w/w)/100

1000: Umrechnungsfaktor g in mg

(Die Dichte des probeeigenen Wassers bei 20-25°C ist praktisch gleich 1 g/ml und kann bei der Berechnung unberücksichtigt bleiben.)

### Bestimmung von Citronensäure in Margarine, Speiseöl und Salben

Ca. 5 g homogene Probe in ein Becherglas genau einwiegen, ca. 70 ml bidest. Wasser zugeben und auf beheizbarem Magnetrührer unter starkem Rühren bis zum Sieden erhitzen. Wässrige Phase mit Pipette in 100 ml Messkolben überführen. Extraktion mit ca. 20 ml bidest. Wasser wiederholen.

Messkolben auf 20-25°C bringen und mit bidest Wasser bis zur Marke auffüllen. Messkolben 15 min in Eisbad oder Kühlschrank stellen. Durch Faltenfilter filtrieren. Filtrat, je nach erwarteter Citronensäure-Konzentration, verdünnt oder unverdünnt zum Test einsetzen.

## Bestimmung von Citronensäure in Citronensäure-Estern

(z.B. Glycerid-Citronensäure-Ester, Emulgatoren)

In Monoglycerid- bzw. Diglycerid-Citronensäure-Estern gebundene Citronensäure kann neben freier Citronensäure (Citrat) bestimmt werden, indem die Probe mit Chloroform extrahiert und anschliessend die Ester mit Kalilauge verseift werden. Hierzu wird wie folgt verfahren:

Zerkleinerte und homogenisierte Proben, welche bis zu etwa 120 mg Monoglycerid-Citronensäure-Ester (z.B. Monooleyl-citrylglycerid-Ester, MG ca. 550) oder bis zu 170 mg Diglycerid-Citronensäure-Ester (z.B. Dioleyl-ci-trylglycerid-Ester, MG ca. 810) enthält, im 250 ml Rundkolben mit ca. 50 ml Chloroform etwa 2 Stunden lang am Rückflusskühler beim Sieden halten, filtrieren und mit Chloroform nachwaschen. Chloroform am Rotationsverdampfer abdampfen. Den weitgehend trockenen Rückstand mit 25 ml methanolischer Kalilauge (1 M) 10 min lang am Rückflusskühler kochen. Lösung auf 20-25°C abkühlen lassen und mit ca. 5 ml Salzsäure (5 M) neutralisieren bzw. schwach ansäuern. Lösung in 100 ml-Messkolben quantitativ überspülen, mit Wasser bis zur Marke auffüllen, schütteln und filtrieren. Weitgehend klare Lösung zum Test einsetzen.

Zur Gehaltsbestimmung ist das Molekulargewicht des Glycerides zugrunde zu legen.

## 12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch anwendbar bei der Untersuchung von Papier, Kosmetika, Detergenzien (s. Lit. 3.6), Pharmaka sowie biologischen Proben.

Weitere Hinweise zu Probenahme, Behandlung und Stabilität der Probe s. Lit. 1.3 und 1.5.

### Bestimmung von Citronensäure in Fermentationsproben und Zellkulturbedien

Analysenprobe, ggf. nach Zentrifugation, zum Abstoppen enzymatischer Vorgänge 15 min in Wasserbad (80°C) stellen und anschliessend zentrifugieren. Überstand, ggf. gemäss Verdünnungstabelle verdünnt, zur Bestimmung einsetzen. (Alternativ kann auch eine Enteiweissung mit Perchlorsäure erfolgen. Siehe die oben beschriebenen Anwendungsbeispiele.)

Gallertartige Agar-Medien mit Wasser homogenisieren und wie oben beschrieben weiterbehandeln.

## Literatur

- 1.1 Gruber, W. & Möllering, H. (1966) Citrat-Lyase und Bestimmung von Citrat, Biochemische Zeitschrift **346**, 85-88
- 1.2 Möllering, H. & Gruber, W. (1966) Determination of citrate with citrate lyase, Anal. Biochem. **17**, 369-376
- 1.3 Dagley, St. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1607-1611; Verlag Chemie Weinheim und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1562-1565, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
- 1.4 Möllering, H. (1985) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VII, pp. 2-12; Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- 1.5 Passonneau, J. V. & Brown, J. G. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl. Bd. 2, S. 1613-1614, Verlag Chemie Weinheim und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 2nd ed., vol. 3, p. 1568, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
- 2.1 Bundesverband der Deutschen Feinkostindustrie e.V. Bonn; Analysenmethoden: Bestimmung von Citronensäure in Tomatenmark, IV/41 (Dezember 1979)
- 2.2 Norme Française Homologuée NF V 76-104 (Octobre 1980) Jus de Fruits et Jus de Légumes, Détermination de la Teneur en Acides Carboxyliques
- 2.3 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64. LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Citronensäure (Citrat) in Fleischerzeugnissen, 0700-13 (November 1981); Bestimmung von Citronensäure (Citrat) in Wurstwaren, 0800-15 (November 1981); Bestimmung von Citronensäure in Tomatenmark, 26.11.03-5 (Mai 1983); Bestimmung von Citronensäure in Tomatenketchup und vergleichbaren Erzeugnissen, 52.01.01-5 (November 1983); Enzymatische Bestimmung des Gehaltes an Citronensäure (Citrat) in Frucht- und Gemüsesäften, L 31.00-14 (Januar 1997); Bestimmung des Gehaltes an Citronensäure (Citrat) in Gemüsesäften, spektralphotometrische Bestimmung von NADH, 26.26-12 (Januar 1997)
- 2.4 Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 61B (Enzymatische Bestimmungen)/3.1 (1981), Kapitel 2A (Milchmischgetränke)/18 (1980), Kapitel 2B (Sauermilchprodukte)/15 (1980), Kapitel 4 (Milchdauerwaren)/10.3 (1993), Kapitel 28A (Frucht- und Gemüsesäfte u.a.)/7.5 (1988), Kapitel 30 (Wein)/36 (1967), Kapitel 30A (Wein aus Trauben)/6.4 (1993), Kapitel 34 (Gärungssessig)/4.5 (1994), Kapitel 34A (Essig und essigähnliche Erzeugnisse)/21 (1970)
- 2.5 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau **77**, 4-5
- 2.6 Brautechnische Analysenmethoden, Band III, S. 565-568 (1982), Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK)
- 2.7 International Federation of Fruit Juice Producers (IFU, Methods of Analysis, no. 22-1985); enthalten in "Code of Practice for Evaluation of Fruit and Vegetable Juices" (1996) edited by Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Economic Community (A.I.J.N.)

2.8 Henniger, G. & Mascaro, L. (1985) Enzymatic-ultraviolet determination of citric acid in wine, J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68**, 1024-1027

2.9 Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (1990), 15th ed., vol. 2, p. 746 (985.11)

2.10 Deutsche Norm DIN 10325 (Januar 1986) Bestimmung des Citronensäuregehaltes in Schmelzkäse (Enzymatisches Verfahren)

2.11 Nederlandse Norm NEN 2851 (1e druk, september 1987) Vruchtesappen: Bepaling van het citronenzuurgehalte; Enzymatische methode (Fruits juices - Determination of the citric acid content - Enzymatic method)

2.12 RSK-Values, The Complete Manual, Guide Values and Ranges of Specific Numbers for Fruit Juices and Nectars, Including the Revised Methods of Analysis (1987), 1st ed., Verlag Flüssiges Obst/Liquid Fruit, D-56370 Eschborn, pp. 97-100

2.13 Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, Complément n° 1 à l'édition officielle de juin 1990, OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNÉ ET DU VIN, S. 187-189

2.14 Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 272 (3. Oktober 1990), Rechtsvorschriften: Verordnung (EWG) Nr. 2676/90 der Kommission vom 17. September 1990 zur Festlegung gemeinsamer Analysemethoden für den Weinsektor (S. 94-96); Official Journal of the European Communities L 272 (3 October 1990), Legislation: Commission Regulation (EEC) No 2676/90 of 17 September 1990 determining Community methods for the analysis of wines (pp. 94-96)

2.15 International Dairy Federation, Provisional Standard 34C (1992) Cheese & Processed Cheese products, Determination of Citric Acid Content (Enzymatic Method)

2.16 Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, VDLUFA (1993) Enzymatische Bestimmung des Citronensäuregehaltes in Käse und Schmelzkäse, Methodenbuch Band VI, C8.7

2.17 Deutsche Norm DIN EN 1137 (Dec. 1994) Frucht- und Gemüsesäfte; Enzymatische Bestimmung des Gehaltes an Citronensäure (Citrat); Spektralphotometrische Bestimmung von NADH (1994) (Fruit and vegetable juices; Enzymatic determination of citric acid (citrate) content; NADH spectrometric method)

2.18 European Standard EN 1137 (Dec. 1994) Fruit and vegetable juices, Enzymatic determination of citric acid (citrate) content by the NADH spectrometric method

2.19 Deutsche Norm DIN 10259 (Juni 1998) Material zur Herstellung von Umhüllungen für Zigarettenfilter, Zigaretten und andere Tabakerzeugnisse, Bestimmung des Citratgehaltes

2.20 International Standard ISO 2963 (März 1997) Cheese and processed cheese products - Determination of citric acid content - Enzymatic method

2.21 Standard der Russischen Föderation / Standard of the Russian Federation / Gosstandart Rossii GOST R 51129-98 (1998) Fruit and vegetable juices. Method for determination of citric acid (citrate)

2.22 Standard der Russischen Föderation / Standard of the Russian Federation / Gosstandart Rossii GOST R 51257-99 (1999) Processed cheese. Method for determination of citric acid content

3.1 Mayer, K. & Pause, G. (1965) Eine enzymatische Citronensäure-Bestimmung, Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. **56**, 454-458

3.2 Mayer, K. & Pause, G. (1969) Enzymatische Zitronensäurebestimmung an gerb- und farbstoffreichen Weinen, Lebensm.-Wiss. Technol. **2**, 143

3.3 Büsching, L. (1968) Methode zur enz. Bestimmung von Citronensäure und Brenztraubensäure in Zuckerfabrikationsprodukten, Zucker **21**, 531-535

3.4 Schiweck, H. & Büsching, L. (1971) Citronensäure- und Raffinosegehalt in Zuckerrübenwurzelkörpern und -blättern während des Wachstums und Füllung der Citronensäure während der Saffreinigung, ZUCKER **24**, 249-253

3.5 Piendl, A. (1974) Citrat im Bier, Brauwissenschaft **27**, 250-257 und 305-311

3.6 Taraborelli, J. A. & Upton, R. P. (1975) Enzymatic Determination of Citrate in Detergent Products, J. Am. Oil Chem. Soc. **52**, 248-251

3.7 Gerstenberg, H. (1978) Nachweis von Teigsäuerungsmitteln in Brot aufgrund des Zitronensäuregehalts, Lebensm. Chemie u. gerichtl. Chemie **32**, 125-126

3.8 Seppi, A. & Sperandio, A. (1983) L'acido citrico nei vini, determinazione con metodo enzimatico e con metodo chimico ufficiale, La Rivista della Società Italiana di Scienza dell' Alimentazione **12**, 479-482

3.9 Lagemann, M., Anders, D., Graef, V. & Bödeker, R.H. (1985) Einfluß von Kakao auf die Ausscheidung von Oxalat, Citrat, Magnesium und Calcium im Urin bei Kindern, Monatsschr. Kinderheilkd. **133**, 754-759

3.10 Klopfer, W. J., Angelino, S.A.G.F., Tuning, B. & Vermeire, H.A. (1986) Organic acids and glycerol in beer, J. Inst. Brew. **92**, 225-228

3.11 Talpay, B. (1988) Inhaltsstoffe des Honigs - Citronensäure (Citrat), Deutsche Lebensmittel-Rundschau **84**, 41-44

3.12 Schlimme, E., Lorenzen, P. Chr., Martin, D. & Thormählen, K. (1996) Analytical differentiation of butter types by specific compositional parameters of the aqueous butter phase, Milchwissenschaft **51**, 139-143

3.13 Saalfeld, U. & Freund, W. (1999) Charakterisierung pulverisierter Sauerteige und Möglichkeiten ihrer qualitativen Bestimmung im Brot - Teil 1: Säuregehalt und Abbaumöglichkeiten für L-Malat und Citrat, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **95**, 209-219

# Citronensäure-Testkontroll-Lösung (Flasche 3)

**Konzentration\*** : siehe Flaschenetikett

Citronensäure-Testkontroll-Lösung ist eine stabilisierte wässrige Lösung von Citronensäure. Sie dient als Testkontroll-Lösung für die enzymatische Bestimmung von Citronensäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien.

## Anwendung:

### 1. Zusatz der Citronensäure-Testkontroll-Lösung zum Testansatz:

Die Testkontroll-Lösung wird anstelle der Probelösung zur Bestimmung eingesetzt.

### 2. "Quantitativer Nachstart"

Nach Ablauf der Reaktion mit Probelösung und Messung von  $E_2$  werden 0,100 ml der Testkontroll-Lösung zum Probeansatz gegeben. Nach Ablauf der Reaktion (ca. 10 min.) wird die Extinktion  $E_3$  gemessen. Aus der Differenz ( $E_2 - E_3$ ) wird nach der allgemeinen Berechnungsformel die Konzentration berechnet. Hierbei ist das geänderte Gesamtvolumen zu berücksichtigen. Wegen der Verdünnung des Testansatzes durch die Zugabe der Testkontroll-Lösung weicht das Ergebnis geringfügig von der Angabe des Flaschenetiketts ab.

\* Als wasserfreie Citronensäure angegeben

### 3. Interner Standard:

Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung (keine groben Fehler bei Testansatz; Probe ist frei von Hemmstoffen) kann die Testkontroll-Lösung als interner Standard verwendet werden:

| In Küvetten pipettieren | Leerwert | Probe    | Standard | Probe + Standard |
|-------------------------|----------|----------|----------|------------------|
| Lösung 1                | 1,000 ml | 1,000 ml | 1,000 ml | 1,000 ml         |
| Probelösung             | -        | 0,200 ml | -        | 0,100 ml         |
| Testkontroll-Lsg.       | -        | -        | 0,200 ml | 0,100 ml         |
| bidest. Wasser          | 2,000 ml | 1,800 ml | 1,800 ml | 1,800 ml         |

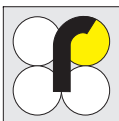
mischen, nach ca. 5 min Extinktionen der Lösungen messen ( $E_1$ ). Weiter verfahren wie im Arbeitsschema bei "Bestimmungsansatz" angegeben. Die entsprechenden Fussnoten und "Hinweise zur Testdurchführung" sind zu beachten.

Die Wiederfindung des Standards berechnet sich nach:

$$\text{Wiederfindung} = \frac{2 \times \Delta E_{\text{Probe + Standard}} - \Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}} \times 100 [\%]$$

## Ebenfalls verfügbar:

**Test-Combination D-Isocitronensäure, Best. Nr. 10 414 433 035**



R-BIOPHARM AG  
 An der neuen Bergstraße 17  
 D-64297 Darmstadt  
 Telefon + 49 61 51 / 81 02-0  
 Fax + 49 61 51 / 81 02-20  
 www.r-biopharm.com

