Enzytec™ *Liquid* Лимонная кислота

Арт. No. E8230

Ферментативный анализ для определения лимонной кислоты в пищевых продуктах и других образцах 2 x 50 мл R1 и 2 x 12,5 мл R2 – 50 анализов (вручную) / ≥ 500 анализов (автоматический анализатор)

Только для анализа *in vitro*
Хранить при 2 - 8 °C

Описание метода

Ферментативное УФ-определение лимонной кислоты с цитратлиазой (CL), L-малатдегидрогеназой (L-MDH) и L-лактатдегидрогеназой (L-LDH).

Принцип метода

Лимонная кислота (цитрат) расщепляется на оксалоацетат и ацетат в присутствии фермента CL:

Лимонная кислота $\xrightarrow{CL}$ оксалоацетат + ацетат

Полученный оксалоацетат и продукт его декарбоксилирования пируват восстанавливаются до L-малата и L-лактата соответственно:

Оксалоацетат + НАДН + H^+ $\xrightarrow{L\text{-}MDH}$ L-малат + $НАД^+$

Пируват + НАДН + H^+ $\xrightarrow{L\text{-}LDH}$ L-лактат + $НАД^+$

Восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) окисляется до НАД. Количество потребленного НАДН эквивалентно количеству преобразованной лимонной кислоты и измеряется при длине волны 340 нм.

Реагенты

Все реагенты готовы к использованию.

- Реагент 1: 2 x 50 мл (NADH, L-MDH, L-LDH)
- Реагент 2: 2 x 12.5 мл (буфер, CL)

Реагенты стабильны до конца указанного срока годности при хранении при температуре 2–8 °C (см. этикетку). Не замораживайте реагенты. Дайте реагентам достичь комнатной температуры перед использованием (20–25 °C).

При работе с реагентами должны применяться общие правила безопасности. Не глотать! Избегайте контакта с кожей и слизистыми оболочками.

Этот комплект может содержать опасные вещества. Примечания об опасности содержащихся веществ см. в соответствующих паспортах безопасности материалов (MSDS) для этого продукта, доступных онлайн на сайте www.rbiopharm.com. После использования реагенты могут быть утилизированы вместе с лабораторными отходами. Упаковочные материалы могут быть переработаны.

Пробоподготовка

- Используйте жидкие и прозрачные образцы сразу или после разбавления до соответствующего диапазона измерений (см. характеристики теста).
- Отфильтруйте или отцентрифугируйте мутные растворы.
- Дегазируйте образцы, содержащие углекислый газ.
- Осветлете образцы, содержащие белки, с помощью реактива Карреза.
- Измельчите и гомогенизируйте твердые или полутвердые образцы и экстрагируйте водой (например, 30 мин при 60–
- 70°C). Отфильтруйте или отцентрифугируйте, или при необходимости добавте реактив Карреза.
- Образцы, содержащие жир, экстрагируйте горячей водой, охладите для отделения жира (в холодильник или льдом), удалите жировой слой и отфильтруйте водную часть.

Процедура анализа

Длина волны: 340 нм
Температура: 37 °C или 20 - 25 °C
Измерения: против воздуха или против воды
Образцы: 25 - 1000 мг/л

	Холостой образец	Образец / Контроль
Реагент 1 **Образец/Контроль** **Дист. воды**	2000 мкл - 100 мкл	2000 мкл 100 мкл -
Перемешать, инкубировать 3 мин при 20 - 37 °C. Измерить абсорбцию A_1, затем добавить:		
Reagent 2	500 мкл	500 мкл
Перемешать, подождать конца реакции (инкубировать прим. 15 мин при 20 - 37 °C) и измерить абсорбцию A_2.		

Холостой образец должен ставиться параллельно исследуемым пробам и стандартам для каждого анализа и вычитаться из результата каждого образца.

Вычисление результатов

Вычисления для растворов образцов:

$$\Delta A = (A_1 \times df - A_2)_{образца} - (A_1 \times df - A_2)_{RB}$$

df: фактор разведения
RB: Холостой образец

$$df = \frac{(объём\ образца + R1)}{(исслед.объём)} = 0.808$$

$$c_{Лимонная\ кислота}\ [г/л] = \frac{(V \times MW \times \Delta A)}{(\varepsilon \times d \times v \times 1000)}$$

V:	Исследуемый объём [мл]	= 2.600
MW:	Молекулярная масса [г/моль]	= 192.13
d:	Оптический путь [см]	= 1.00
v:	Объём образца [мл]	= 0.100
ε:	Коэффициент экстинкции NADH [л/ммоль x см]	= 6.3 (при 340 нм)

Результаты при определении при 340 нм:

$$\mathbf{c_{Лимонная\ кислота}\ [г/л] = 0.7929 \times \Delta A}$$

Вычисления для твёрдых образцов:

$$Содержание_{Лимонная\ кислота}\ [г/100\ г] = \frac{c_{Лимонной\ кислоты}\ [г/л]}{масса_{образца}\ [г/л]} \times 100$$

Характеристики теста

Специфичность

Тест специфичен для лимонной кислоты и не показывает побочных действий или взаимодействий с другими соответствующими кислотами. Сульфит и мезовинная кислота не мешают при концентрации 3,13 г/л или ниже.

Линейность & Диапазон измерений

Линейность дается до 1400 мг/л лимонной кислоты.
Рекомендуемый диапазон измерения составляет от 25 до 1000 мг/л лимонной кислоты.
Если этот диапазон превышен, образцы следует разбавить дист. воды до концентрации аммиака в пределах диапазона измерения. При расчете необходимо учитывать коэффициент разбавления.

Чувствительность

Предел обнаружения (LoD) и предел количественного определения (LoQ) определяли по методу DIN 32645:2008-11 в забуференном водном растворе:

- Объём образца v = 100 мкл: LoD = 15 мг/л
  LoQ = 25 мг/л
- Объём образца v = 1000 мкл*: LoD = 2 мг/л
  LoQ = 3 мг/л

*для увеличения объема образца требуется нейтрализация pH

Автоматизация & Валидационный отчёт

Листы приложений для автоматизированных систем и отчеты о проверке клиентов доступны по запросу.

Официальный дистрибьютор в России:
ООО "НеоТест"
ул. Растопчина, 1Г, г. Вламидир
+7 499 649 02 01
info@neo-test.ru
www.neo-test.ru

Официальный дистрибьютор в Беларуси:
ОДО "КомПродСервис"
ул. Филимонова, 25Г, г. Минск
+375 17 336 50 54
info@komprod.com
www.komprod.com

R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17,
64297 Darmstadt, Germany, www.r-biopharm.com