

Citric acid



ULTIMA REVISION: MAYO DE 2006 POR LIC. NOEL SILVA D/ LIC. NIRSEN GARCÍA

RENDIMIENTO CONDICIONADO A LA INSTRUMENTACIÓN UTILIZADA:

VOLUMEN MÍNIMO DE MEDICION A 2,0 mL, EJEMPLO: SPECTRONIC 20, RENDIMIENTO ES IGUAL A: 12 PRUEBAS.

VOLUMEN MÍNIMO DE MEDICION A 1,0 mL, EJEMPLO: STAT FAX, RENDIMIENTO ES IGUAL A: 24 TESTS.

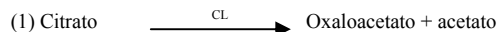
VOLUMEN MÍNIMO DE MEDICION A 0,5 mL, EJEMPLO: RAYTO 1904C , RENDIMIENTO ES IGUAL A: 48 TESTS. (MICROCUBETAS DE 0,5 mL).

Definición del método:

Ensayo para la determinación de Ácido Cítrico (Citrato) en distintos tipos de muestras (Orina, esperma, suero, y otros).

Principio (Ref. 1)

El Ácido Cítrico (Citrato) es convertido en oxaloacetato y en acetato en una reacción catalizada por la enzima Citrato Liasa (CL).



En la presencia de la enzimas L-malato deshidrogenasa (L-MDH) y lactato deshidrogenasa (L-LDH), el oxaloacetato y su producto descarboxilado: el piruvato, son reducidos a L-malato y L-lactato respectivamente por la nicotinamida dinucleótido adenina (NADH). (2,3).



La cantidad de NADH oxidada en las reacciones (2) y (3) es estequiométricamente igual a la cantidad de citrato presente en la muestra. NADH se determina espectrofotométricamente por su absorbancia en las longitudes de onda 334, 340, 365 nm.

El test de Ácido Cítrico r-biopharm contiene:

1. Tres botellas "1", cada una con aprox. 1.4 g de liofilizado, el cual consiste en: Buffer de glicilglicina pH aprox. 7.8; L-malato deshidrogenasa, aprox. 136 U; L-lactato deshidrogenasa, aprox. 280 U; NADH, aprox. 5 mg; estabilizadores.
2. Tres botellas "2", cada una con aprox. 50 mg de un liofilizado de la enzima Citrato Liasa, aprox. 12 U.
3. Solución estándar de Ácido Cítrico para procedimientos de control de calidad del ensayo. (El uso de la misma no es requerido para el calculo de los resultados). Usar sin diluir.

Preparación de las soluciones:

1. Disolver los contenidos de la botella "1" con 12 mL de agua bi-destilada.
2. Disolver el contenido de la botella "2" en 0.3 mL de agua bi-destilada.

Estabilidad de los reactivos:

El contenido de la botella (sin reconstituir) "1" y "2" son estables a +4°C hasta la fecha de vencimiento del paquete.

La solución "1" reconstituidas, son estables a +4°C por dos semanas o bien hasta por 4 semanas a -20°C.

La solución "2" es estable por una semana a +4°C y por 4 semanas a -20°C.

Dejar que la solución 1 alcance temperatura ambiente antes de su uso.

Preparación de la muestra de Orina de 24 Horas:

La muestra debe ser recolectada usando HCL como preservativo, y almacenada de 2-8°C para su conservación, de esta forma se puede almacenar hasta un mes.

Agitar y/o mezclar bien el envase de manera de garantizar la distribución de todos los componentes de la muestra.

La Orina debe tener un pH indudablemente ácido (pH=3).

Tomar 10 mL de la muestra de Orina de 24 horas y centrifugar hasta obtener un sobrenadante claro y transparente.

Para el ensayo, utilizar un tubo para blanco y otro para muestra, y proceder según la tabla siguiente: (si se van a ensayar varias muestras, se puede utilizar el mismo valor de blanco para todas, ya que se trata de un blanco de reactivo).

Procedimientos dependiendo del volumen final a utilizar:**Procedimiento para un volumen final de aproximadamente 3,0 mL.**

Pipetear en la cubetas	Blanco (mL)	Muestra (mL)
Solución 1	1.000	1.000
Sobrenadante de la muestra*	-	0.200
Agua bidestilada	2.000	1.800
Mezclar**, leer la absorbancias a 340 nm de las soluciones (A ₁) después de aproximadamente 5 min. Y comenzar la reacción con la adición de:		
Solucion 2	0.020	0.020
Mezclar**, hasta completar la reacción (aprox. 5 min.) y luego leer las absorbancias a 340 nm de las soluciones (A ₂).		

*Enjuagar (procedimiento de curado) la punta de la pipeta con la muestra antes de tomar el volumen necesario para agregar a la cubeta.

**Por ejemplo, con una espátula plástica o por agitación suave luego de cerrar la cubeta con papel parafilm®.

Procedimiento para un volumen final de aproximadamente 1,5 mL.

Pipetear en la cubetas	Blanco (mL)	Muestra (mL)
Solución 1	0.500	0.500
Sobrenadante de la muestra*	-	0.100
Agua bidestilada	1.000	0.900
Mezclar**, leer la absorbancias a 340 nm de las soluciones (A ₁) después de aproximadamente 5 min. Y comenzar la reacción con la adición de:		
Solucion 2	0.015	0.015
Mezclar**, hasta completar la reacción (aprox. 5 min.) y luego leer las absorbancias a 340 nm de las soluciones (A ₂).		

*Enjuagar (procedimiento de curado) la punta de la pipeta con la muestra antes de tomar el volumen necesario para agregar a la cubeta.

**Por ejemplo, con una espátula plástica o por agitación suave luego de cerrar la cubeta con papel parafilm®.

Procedimiento para un volumen final de aproximadamente 0,750 mL.

Pipetear en la cubetas	Blanco (mL)	Muestra (mL)
Solución 1	0.250	0.250
Sobrenadante de la muestra*	-	0.050
Agua bidestilada	0.500	0.450
Mezclar**, leer la absorbancias a 340 nm de las soluciones (A ₁) después de aproximadamente 5 min. Y comenzar la reacción con la adición de:		
Solucion 2	0.015	0.015
Mezclar**, hasta completar la reacción (aprox. 5 min.) y luego leer las absorbancias a 340 nm de las soluciones (A ₂).		

*Enjuagar (procedimiento de curado) la punta de la pipeta con la muestra antes de tomar el volumen necesario para agregar a la cubeta.

**Por ejemplo, con una espátula plástica o por agitación suave luego de cerrar la cubeta con papel parafilm®.

Procedimiento (notas importantes):

Longitud de onda: 340 nm.

Cubetas de vidrio: 1.00 cm de recorrido de la luz.

Temperatura: 20-25°C.

Leer en contra del aire (sin cuvetas en el recorrido de la luz en el espectrofotómetro) o usar un blanco con agua pura.

Muestra: desde 0.200-2.000 mL de volumen de muestra).

Calculo de los resultados:

Determinar la diferencia de absorbancias:

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{\text{muestra}} - (A_1 - A_2)_{\text{blanco}}$$

Ocasionalmente se puede obtener un valor negativo con $(A_1 - A_2)_{\text{blanco}}$. Este valor deberá ser sumado a $(A_1 - A_2)_{\text{muestra}}$, se acuerdo a la formula expresada anteriormente.

La diferencia de absorbancias deberán ser como regla, al menos 0-100 unidades de absorbancias, para así lograr resultados suficientemente exactos.

Si la diferencia de absorbancia de la muestra ($\Delta A_{\text{muestra}}$) es mayor a 1.000, la concentración de Citrato de la muestra es muy grande, se deberá entonces diluir la muestra y tomar esta dilución en consideración para el calculo de los resultados.

- $C_{\text{citrato}} = 0.4620 \times \Delta A = \text{g/L}$ (cuando se usa un volumen final de **3,020 mL**)
- $C_{\text{citrato}} = 0.4636 \times \Delta A = \text{g/L}$ (cuando se usa un volumen final de **1,515 mL**)
- $C_{\text{citrato}} = 0.4682 \times \Delta A = \text{g/L}$ (cuando se usa un volumen final de **0,765 mL**)

Para obtener **mg/dL**, multiplicar el valor obtenido por 100.

Para obtener **mg/24 horas**:

$C_{24\text{horas}} = 0.4620$ (ó de acuerdo al volumen final) $\times \Delta A \times 1000 \times \text{Volumen de muestra}$ **mg de Citrato/24 Horas.**

La formula viene de:

$$C = \frac{V \times MW \times \Delta A \text{ (g/L)}}{\epsilon \times D \times v \times 1000}$$

V = Volumen Final (3.020 mL).

v = Volumen de muestra (0.200 mL).

MW= Peso molecular de la sustancia a ser ensayada en g/mol, en nuestro caso 189.1 (peso molecular del ion citrato).

d= paso de la luz en cm. En nuestro caso 1 cm.

ϵ = Coeficiente de extinción molar del NADH en 340 nm, en nuestro caso $6.18 \text{ L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Notas Importantes:

1. Si diluye la muestra, recuerde tomar en cuenta el factor de dilución para el calculo.

Si la diferencia de absorbancias medidas ΔA es muy bajo (e.j. < 0.100), la muestra debe ser preparada otra vez, o el volumen de la muestra debe ser aumentado en un valor no mayor de 2.000 mL, reduciendo a su vez el volumen de agua en la cubeta de forma equivalente, para así no alterar al volumen final de la prueba. Adicionalmente se debe modificar la formula, en el volumen de muestra, para poder calcular los resultados, por lo que le agradecemos que **para mayor información contacte Corpodiagnostica C. A. al 0212-5168488.**

Valores de referencia en Orina:

ADULTOS: 320 a 1240 mg/24 horas.

NIÑOS: 140 – 940 mg/24 horas.

Información diagnostica de la determinación de Citrato en Orina:

La excreción promedio de citrato en pacientes con urolitiasis de calcio idiopatica, se ha encontrado mas baja que en los grupos control aparentemente sanos. La hipocitraturia (excreción baja de citrato en orina) es común en pacientes con urolitiasis, lo cual puede resultar como consecuencia de una acidosis tubular renal, así como también se observa en pacientes con hiperoxaluria enterica. Adicionalmente la excreción de citrato es baja en la insuficiencia renal.

Un nivel por debajo de lo normal puede indicar acidosis tubular renal. Los niveles se pueden ver incrementados como consecuencia de una dieta rica en carbohidratos, terapia estrogénica o terapia con vitamina D.

Información técnica de la prueba

La técnica es especifica para ácido cítrico con un valor cercano al 100%. La limite inferior de detección es de 2.5 mg/L y la linealidad va hasta 4000 mg/L. El coeficiente de variación se determino en 4.4 %.

Otras aplicaciones en Diagnostico Clínico:

Determinación de Ácido Cítrico en Plasma, suero o Esperma, Favor contacte Corpodiagnostica C. A. al 0212-5168488.

Citric acid assay control solution

Concentración: Ver la etiqueta en la botella.

Se debe usar sin diluir.

Esta solución acuosa de ácido cítrico esta debidamente estabilizada, y sirve como control de calidad para el ensayo.

References

- 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 and (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 and (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 §35 LMBG; *Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Citronensäure (Citrat) in Fleischerzeugnissen*, 07.00-13 (November 1981); *Bestimmung von Citronensäure (Citrat) in Wurstwaren*, 08.00-15 (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); *Bestimmung von Citronensäure (Citrat) in Fruchtsäften*, 31.00-14 (November 1984); *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); contained 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.)
4
- 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 (1985.11)
- 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 no 1 à l'édition officielle de juin 1990*, OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE 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 Analysenmethoden 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 (Dez. 1994) Frucht- und Gemüsesäfte; Enzymatische Bestimmung des Gehaltes an Citronensäure (Citrat); Spektralphotometrische Bestimmung von NADH (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 Saftreinigung, 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 Societa 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 Klopper, 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 Abbauvermögen für L-Malat und Citrat, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **95**, 209-219