

Metodo enzimatico per vini, alimenti e bevande
(33 test in manuale / 330 test in automazione)

Solo per uso *in vitro*
Conservare tra +2 – +8 °C

Principio

La β-idrossibutirrato deidrogenasi (β-HB-DH) catalizza l'ossidazione del β-idrossibutirrato ad acetato con simultanea riduzione del NAD a NADH, il quale viene misurato a 340 nm:



Reagenti

#1: Buffer (tampono Good, pH > 7,5): 2 flaconi da ca. 50 mL

#2: NAD (NAD > 250 mol/L): 10 flaconi da ca. 10 mL

#3: β-HB-DH (β-HB-DH > 50 KU/L, attivatori, stabilizzatori):
1 flacone da ca. 20 mL (pronto all'uso)

#4: Standard (β-idrossibutirrato = 500 mg/L, NaN3 < 0,1%):
1 flacone da ca. 5 mL

I reagenti chiusi sono stabili fino alla data di scadenza indicata in etichetta, se conservati nel loro contenitore primario integro tra 2 e 8°C, a condizione che non siano stati contaminati durante il loro utilizzo. In caso di danneggiamento del contenitore primario, provvedere allo smaltimento.

Il reagente deve essere impiegato solo per l'uso indicato da personale esperto ed addestrato. I reagenti contengono sodio azide come conservante, in concentrazione totale inferiore ai limiti riportati nelle Dir.67/548/CEE e 88/379/CEE e relative modifiche per la classificazione, etichettatura ed imballaggio di preparati pericolosi (Reagenti). Non ingerire. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.

Applicare le comuni norme di sicurezza necessarie in un laboratorio chimico. Dopo l'impiego, i reattivi devono essere eliminati come rifiuti di laboratorio.

Preparazione del reagente di lavoro

Dissolvere una vial di R2 –NAD con 10 mL di R1 -BUFFER. Mescolare gentilmente fino a dissoluzione completa. Evitare la formazione di schiuma. Portare il Reagente alla temperatura di lavoro prima dell'uso. Chiudere immediatamente dopo l'impiego.

Stabilità del reagente di lavoro: 7 giorni a 2-8°C.

Preparazione dei campioni

- Utilizzare direttamente i campioni chiari, trasparenti e abbastanza neutri, la cui concentrazione di β-idrossibutirrato si trova all'interno dell'intervallo di misura (800 mg/L). Altrimenti, diluire con acqua distillata e moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione (performance del test)
- Filtrare o centrifugare campioni torbidi.
- Quando necessario, utilizzare i metodi classici di preparazione per i test enzimatici (filtrazione o centrifugazione per campioni torbidi, estrazione, deproteinazione con Carrez, etc..).

Procedura del test

Lunghezza d'onda : 340 nm

Cammino ottico: 1 cm (vetro, plastica)

Temperatura: 37°C

Metodo: punto finale

Linearità: fino a 800 mg/l

	Bianco reagente	Campione
Reagente R2-NAD	3000 µl	3000 µl
Campione/standard	-	50 µl
Acqua distillate	50 µl	-
Mescolare gentilmente e incubare a 37°C per circa 3 min. Leggere l'assorbanza A1, quindi aggiungere:		
β-HB-DH (R3)	500 µl	500 µl
Miscelare gentilmente ed incubare esattamente 15 min a 37°C e leggere l'assorbanza A2. Attendere altri 5 minuti esatti e leggere l'assorbanza A3		

Calcolo dei risultati

Scelta 1: Legge di Lambert-Beer

Determinare la differenza di assorbanza ΔA per il bianco reagente ed i campioni:

$$\Delta A = (A_2 - df \times A_1) - 3(A_3 - A_2)$$

Con *df* (fattore di diluizione) = fattore di diluizione della densità ottica,

calcolato sulla base dei volumi di reattivi aggiunti durante il test:

$$df = (\text{campione} + R1) / (\text{campione} + R1 + R2) = 3050/3550 = 0,859$$

- La differenza $A_3 - A_2$ rappresenta la reazione "creep", che viene sottratta della reazione misurata durante i primi 15 min.

Sottrarre il bianco reagente di ogni campione e calcolare la concentrazione:

$$\Delta A_{\beta\text{-idrossibutirrato}} = \Delta A_{\text{Campione}} - \Delta A_{\text{Bianco reagente}}$$

$$c = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \text{ [g/l]}$$

$$c = (3,550 \times 104,1 \times \Delta A) / (6,3 \times 1,00 \times 0,050 \times 1000)$$

$$c = 1,1732 \times \Delta A \text{ [g/l] a 340 nm}$$

Con questo metodo è possibile utilizzare lo standard (flacone 4) come controllo qualità, anziché come calibratore.

Scelta 2: Curva di calibrazione

Calcolare per ogni punto di Standard ΔA_{ST} e per ogni Campione ΔA_C . Riportare per ogni Calibratore i valori di ΔA_{ST} contro la concentrazione dello standard per costruire la curva di calibrazione. La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto, del reagente e/o del calibratore. Riportare ogni valore di ΔA_C trovato sulla curva di calibrazione per determinare la concentrazione dei campioni analizzati.

Calcoli ulteriori

Se il campione è stato diluito, moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

Per campioni solidi con estrazione in acqua:

$$\text{Contenuto [g/100 g]} = \frac{C \text{ [g/l]}}{\text{Peso}_{\text{estrazione}} \text{ [g/l]}} \times 100$$

Performance del test

1. Non sono note interferenze.
2. **Linearità:** il test è lineare fino a 800 mg/L. Per concentrazioni di β-idrossibutirrato superiori, diluire il campione con acqua distillata, ristare e moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.
3. **Sensibilità (LoD):** il limite di sensibilità, ovvero la concentrazione minima che può essere distinta dallo zero, è di 0,6 mg/L.
4. Su richiesta, sono disponibili le applicazioni su analizzatori biochimici automatici.

Bibliografia

1. Methods of Enzymatic Analysis, Ed. By H.U.Bergmeyer, 3rd ed., Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida Basel (1985).
2. Council Directive (20 June 1989), Official Journal N. L212/87 (89/437/EEC)(1989)
3. Parry A.E.J. et al., J. Sci. Food Agric. 31, 905 (1980)

Dichiarazione liberatoria

I dati corrispondono al nostro attuale stato di tecnologia e forniscono informazioni sui nostri prodotti e sul loro uso. R-Biopharm non fornisce alcuna garanzia, esplicita o implicita, oltre a quella relativa alla qualità standard dei materiali di cui sono costituiti i suoi prodotti. Nel caso tali materiali risultassero difettosi, R-Biopharm si impegna a fornire prodotti sostitutivi. Non esiste garanzia di commerciabilità o di idoneità del prodotto per uno scopo particolare. R-Biopharm non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo del prodotto.