

Enzymatischer Farbtest zur Bestimmung von Cholesterin in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien
Test-Kombination für 55 Bestimmungen

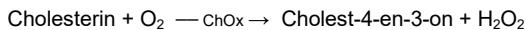
Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

Dieser Test wurde für die folgenden Matrices validiert: Volleipulver, Eigelb, Mayonnaise, Eierlikör, Wurst, Fleischwaren und Butter. Detaillierte Ergebnisse und weitere Informationen zu den Validierungsdaten finden Sie im Validierungsbericht.

Eine empfohlene Probenvorbereitung für Nudeln und eine alternative Probenextraktion für Eierlikör wurden getestet und sind auf Anfrage erhältlich. Andere Lebensmittel oder Probenmaterialien können getestet und müssen vom Anwender validiert werden.

1. Testprinzip

Cholesterin wird durch das Enzym Cholesterinoxidase (ChOx) zu Cholest-4-en-3-on oxidiert:



Das Enzym Peroxidase (POD) katalysiert die nachfolgende Reaktion:



Die Konzentration des entstehenden Chinonimin-Farbstoffes ist der Menge an Cholesterin äquivalent und wird aufgrund seiner Absorption im sichtbaren Bereich bei 492 nm gemessen. Für die Ergebnisberechnung wird ein chinonimin-spezifischer Extinktionskoeffizient verwendet.

Um unspezifische Effekte der Probenmatrix zu berücksichtigen, wird zusätzlich ein Matrix- bzw. Probenleerwert durchgeführt, in dem die **Cholesterinoxidase in Reagenz 1 Blank nicht enthalten** ist.

2. Reagenzien

2.1. Inhalt & Zusammensetzung

Der Test ist für eine manuelle und automatisierte Abarbeitung geeignet. Die Reagenzien reichen bei manueller Abarbeitung für 55 Bestimmungen. Die Anzahl der Bestimmungen bei automatisierter Abarbeitung ist um ein Vielfaches erhöht, jedoch geräteabhängig.

(1) Reagenz 1 <i>Blank</i>	1 x 116 ml	Puffer
(2) Reagenz 1 <i>Sample</i>	1 x 116 ml	Puffer, Cholesterinoxidase
(3) Reagenz 2	4 x 14,5 ml	Puffer, 4-Aminoantipyrin, Peroxidase

2.2. Reagenzienvorbereitung

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig und müssen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) gebracht werden. Komponenten nicht zwischen Kits verschiedener Chargen austauschen.

2.3. Lagerung & Haltbarkeit

Die Reagenzien sind bei sachgerechter Handhabung auch nach dem Öffnen bei 2 - 8 °C bis zur aufgedruckten Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren.

Achtung: Reagenz 2 beinhaltet das lichtempfindliche Reagenz 4-Aminoantipyrin und sollte während der Testdurchführung weitestgehend und bei Lagerung stets vor Licht geschützt werden.

Der Puffer darf nicht über 45 °C erhitzt werden, da sonst irreversible Trübungen auftreten können.

2.4. Sicherheit & Entsorgung

Das Produkt/der Test ist ausschließlich zur Anwendung im Rahmen der Zweckbestimmung geeignet. Die Gebrauchsanweisung ist strikt zu befolgen.

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Chemikalien sind zu beachten. Nicht verschlucken sowie Berührung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten sind den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu entnehmen. Nach Gebrauch können die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgt und das Verpackungsmaterial dem Recycling zugeführt werden.

3. Probenvorbereitung

3.1. Zusätzliche Materialien, Reagenzien und Geräte

Für die Probenvorbereitung werden **zusätzlich** die folgenden Materialien, Reagenzien und Geräte benötigt:

- (1) Kaliumhydroxid zur Herstellung einer wässrigen 10 M KOH
- (2) Methanol zur Herstellung einer methanolischen 1 M KOH
- (3) 2-Propanol (Isopropanol)
- (4) Salzsäure zur Herstellung einer 8 M HCl-Lösung
- (5) Calciumchlorid-Dihydrat
- (6) Glasperlen (0,25 - 0,5 mm; z.B. Carl Roth, Art. Nr. A553.1, Karlsruhe, Germany)
- (7) Rundkolben (50 ml)
- (8) Rückflusskühler (passend für 50-ml-Kolben)
- (9) Heizmanschette bzw. Laborheizpilz für 50-ml-Kolben
- (10) Geriffelter oder gefalteter Papierfilter
- (11) Spritzenfilter Polyethersulfon (PES), 0,22 µm
- (12) Messkolben (25 ml, 50 ml, 100 ml)
- (13) Zentrifugenröhrchen
- (14) Spektralphotometer für 4-ml-Küvetten (eingestellt auf 492 nm)
- (15) Acryl-Einwegküvetten (4 ml)

3.2. Allgemeine Probenvorbereitung

- **Halbfeste und pastöse Proben** ausreichend homogenisieren; feste Proben vollständig zerkleinern und quantitativ sieben (Maschenweite ≤ 0,2 mm).
- Die Extraktion des Cholesterins aus der Probenmatrix erfolgt durch **alkalische Hydrolyse**: Kochen unter Rückfluss mit methanolischer Kalilauge und 2-Propanol (siehe **3.1 Zusätzliche Materialien, Reagenzien und Geräte**).
- Hierfür muss eine 1 M methanolische Kalilauge **täglich frisch angesetzt werden**, da handelsübliche methanolische Kalilauge meist Stabilisatoren enthalten, die die Cholesterin-Oxidase inhibieren können. Hierfür wird eine wässrige 10 M KOH mit dem 9-fachen Volumen an Methanol (p.a.) verdünnt.
- **Fettsäuren** können durch Ansäuern der Probe in der Kälte entfernt werden.
- Die Probenvorbereitung für die manuelle und die automatisierte Testdurchführung ist identisch.

3.3. Bestimmung von Cholesterin in Volleipulver, Eigelb, Mayonnaise und Eierlikör

- 1 ± 0,05 g Glasperlen und 0,25 g ± 0,01 g Probe in einen 50 ml Rundkolben einwiegen.
- 20 ml 1 M methanolische KOH und 10 ml 2-Propanol zufügen.
- **Ansatz zum Sieden bringen und anschließend** 30 min unter Rühren am Rückflusskühler unter Sieden erhitzen.
- Überstehende Lösung in einen 50 ml Messkolben geben und auf unter 80 °C (Siedetemperatur 2-Propanol) abkühlen lassen.
- Zugabe **in folgender Reihenfolge**:
 - (1) 6 ml 2-Propanol,
 - (2) 2 ml 8 M HCl sowie
 - (3) 1 g Calciumchlorid-Dihydrat
 Eine vollständige Abkühlung kann nach dieser Zugabe erfolgen.
- Messkolben mit 2-Propanol bis zur Marke auffüllen, wenn die Probe 20 °C bzw. Eichtemperatur des Messkolbens erreicht hat.
- Mischen und für 20 min bei 2 - 8 °C abkühlen lassen (z.B. auf Eis).
- Lösung durch einen Faltenfilter filtrieren und klare Lösung im Test einsetzen.
Steht die Probe länger, kann es zu weiteren Fällungen der Fettsäuren kommen. Die Probe muss dann ggf. erneut filtriert werden. Alternativ einen Spritzenvorsatzfilter verwenden.

Für **reine Pflanzenöle** wird ebenfalls die oben beschriebene Extraktionsmethode empfohlen, um deren Gehalt an Phytosterinen zu charakterisieren.

3.4. Bestimmung von Cholesterin in Wurst-, Fleischwaren und Butter

- 1 ± 0,05 g Glasperlen in einen 50 ml Rundkolben einwiegen.
- 0,25 g der Fleischprobe oder 0,125 g Butter hinzugeben.
- 10 ml 1 M methanolische KOH zufügen.
- **Ansatz zum Sieden bringen und anschließend 25 min unter Rühren am Rückflusskühler unter Sieden erhitzen.**
- Überstehende Lösung in einen 25 ml Messkolben geben und auf unter 80 °C (Siedetemperatur 2-Propanol) abkühlen lassen.
- Rückstand **zweimal** mit je 6 ml 2-Propanol zum Sieden bringen und anschließend unter Rühren am Rückflusskühler erhitzen.
- Lösung in einen 25 ml Messkolben überführen und 1 ml 8 M HCl zugeben.
- Messkolben mit 2-Propanol bis zur Marke auffüllen, wenn die Probe 20 °C bzw. Eichtemperatur des Messkolbens erreicht hat.
- Mischen und Lösung durch einen Faltenfilter filtrieren und **200 µl** der klaren Lösung im Test einsetzen (**Reagenzverdünnungsfaktor df beachten!** → 5.1.1. Gesamtkonzentration Cholesterin).

3.5. Weitere Hinweise

- Die Probenextrakte sollten möglichst klar und ohne Ausfällungen sein. 2-Isopropanol kann bei längerer Einwirkzeit Acrylatküvetten trüben und/oder schädigen. Dadurch kann es im unteren Teil der Küvette zu Trübungen kommen. Eine längere Standzeit (z.B. in Geräten) ist dementsprechend zu vermeiden.
- Die **Küvettenrührung sollte bei der Messung nicht im Strahlengang liegen**, da sonst eine zu hohe Absorption gemessen wird.
- Auf Siedeverzüge achten/vermeiden!
- Es zeigte sich, dass die Wiederfindung von Cholesterin in Probelösungen deutlich verbessert werden kann, wenn diese über Nacht bei 4 °C stehen und am Folgetag vermessen werden.

4. Testdurchführung

Wellenlänge: 492 nm
 Küvetten: 1 cm Schichtdicke
 Temperatur: 37 °C (während der Messung)
 Messbereich: 20 - 900 mg/l

	Probenleerwert	Probe / Kontrolle
Reagenz 1 Blank	2000 µl	-
Reagenz 1 Sample	-	2000 µl
Probe / Kontrolle	100 µl	100 µl
Mischen, für 3 min bei 37 °C inkubieren. Extinktion E ₁ bei 492 nm messen, dann Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, das Ende der Reaktion abwarten (10 min bei 37 °C) und Extinktion E ₂ messen.		

Der Probenleerwert muss für jede Probe mitbestimmt und vom jeweiligen Probenergebnis abgezogen werden.

Liegt die Messtemperatur unterhalb von 37 °C, kann dies bei Cholesterin-Konzentrationen unter 100 mg/l zu einer etwa 10 % geringeren Probenwiederfindung führen.

4.1. Wichtige Hinweise zur Testdurchführung

Bei der Testdurchführung wird **kein Reagenzleerwert**, sondern ein **Probenleerwert** unter Verwendung des Reagenz 1 Blank (ohne Cholesterinoxidase) mitgeführt. D.h. je Bestimmung werden **zwei** Küvetten benötigt, in die jeweils 100 µl Probe gegeben werden.

- Probenleerwert und Probe müssen **im selben Lauf** und unter gleichen Bedingungen gemessen werden.
- Für die Zugabe von Reagenz 1 *Blank*, Reagenz 1 *Sample* und Reagenz 2 wird die Verwendung einer Multistep-Pipette empfohlen. Verwenden Sie für jede Komponente eine separate Spitze.

- Verwenden Sie für jeden Probenextrakt (und die Kontrolllösungen) separate Spitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden; spülen Sie die Spitze vor dem Pipettieren.
- Das Reagenz darf nur geschwenkt und nicht geschüttelt werden, da es sonst zu einer verstärkten Schaumbildung kommen kann. Es ist darauf zu achten, dass der Strahlengang nicht durch den Schaum geht, da es sonst zu Lichtstreuungen kommen kann und ggf. eine zu hohe Absorption gemessen wird.
- Reagenz 2 enthält einen lichtempfindlichen Farbstoff und sollte erst unmittelbar vor Zugabe aufgezogen und zügig pipettiert werden. Das Photometer ist unmittelbar nach der Zugabe von Reagenz 2 zu schließen.

5. Berechnung der Ergebnisse

5.1. Berechnung bei Probelösungen

5.1.1. Gesamtkonzentration Cholesterin

$$\Delta E_{\text{Cholesterin}} = (E_2 - E_1 \times df)_{\text{Probe oder Kontrolle}} - (E_2 - E_1 \times df)_{\text{PLW}}$$

df: Dilution factor (Reagenzverdünnungsfaktor)
 PLW: Probenleerwert

$$df_{100\mu l} = \frac{\text{Probenvolumen} + \text{Volumen R1}}{\text{Testvolumen}} = 0,808$$

Der angegebene df-Wert von 0,808 gilt für eine Basisapplikation von 100 µl. Eine **Erhöhung des Probenvolumens** (siehe Validierungsbericht) bei unveränderten Reagenzvolumina **erfordert die Umrechnung des Reagenzverdünnungsfaktors (df)**. Bei Erhöhung des Volumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es dies Matrix-abhängig zu überprüfen. Der Probenleerwert ist dem veränderten Probenvolumen anzupassen.

Die Berechnung der Cholesterin-Konzentration erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$C_{\text{Cholesterin}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(E \times d \times v \times 1000)} = 1,648 \times \Delta E \times F$$

Wurde der Probenextrakt vor der Messung verdünnt, muss dieses Ergebnis mit dem Vorverdünnungsfaktor F multipliziert werden.

V: Testvolumen (Basisapplikation) [ml] = 2,600
 MG: Molekulargewicht [g/mol] = 386,65
 d: Schichtdicke [cm] = 1,00
 v: Probevolumen (Basisapplikation) [ml] = 0,100
 ε: Extinktionskoeffizient Chinonimin [L/mmol x cm] = 6,1 (bei 492 nm)

5.2. Berechnung bei Feststoffen

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

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

5.3. Kontrollen & Akzeptanzkriterien

Kontroll- oder Referenzproben sollten zur Qualitätskontrolle bei jedem Lauf mitgeführt werden. Die Wiederfindung von Kontrolllösungen sollte innerhalb 100 ± 5 % liegen. Wir empfehlen dazu die Verwendung von Referenzmaterialien oder Standardlösungen, wie zum Beispiel:

- NIST SRM 1845a Volleipulver
- NIST SRM 1546a Fleischhomogenat

Durch die Unlöslichkeit in Wasser, wird Cholesterin zur Herstellung von Kontroll- oder Referenzproben eingewogen und in gewünschter Konzentration in 2-Propanol gelöst.

Die Eigenschaften des Lösungsmittels müssen bei der Handhabung berücksichtigt werden (z.B. gutes Benetzen der Pipettenspitze, Verwendung einer Direktverdrängerpipette).

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Die Cholesterin-Oxidase oxidiert Cholesterin und andere Sterine, bei denen sich die Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom 3 in β -Stellung befindet (außer Lanosterin). Daher reagieren auch Phytosterine, wie Stigmasterin, β -Sitosterin, Campesterin und Delta-5-Avenasterin zu fast 100 %. Dies muss bei der Berechnung des Eigenhaltes von "Eihaltigen Lebensmitteln" berücksichtigt werden.

Bei der Analyse von tierischen Fetten empfiehlt die Internationale Union für Reine und Angewandte Chemie (IUPAC) die Berechnung der Ergebnisse als Cholesterin (Molmasse 386,64 g/mol), bei der Analyse pflanzlicher Fette die Berechnung als β -Sitosterin (Molmasse 414,69 g/mol).

6.2. Interferenzen

Sulfit, Ascorbinsäure, Nitrat, Nitrit und Oxalsäure stören nicht bis zu einer Konzentration von 1 g/l.

6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Die Linearität ist bis zu 900 mg/l Cholesterin gegeben, wobei der empfohlene Messbereich zwischen 20 und 900 mg/l liegt (Probenvolumen 100 μ l).

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde nach der Methode DIN 32645:2008-11 in 2-Propanol bestimmt. Daraus ergibt sich eine LoD von 4 mg/l respektive 2 mg/l Cholesterin für ein Probenvolumen von 100 μ l bzw. 500 μ l. Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde anhand eines Präzisionsprofils bestimmt und bestätigt eine Konzentration von 20 mg/l respektive 5 mg/l für 100 μ l bzw. 500 μ l Probenvolumen.

7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ Liquid Validierungsberichte
- Enzytec™ Liquid Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid Excel-Auswertevorlagen
- Enzytec™ Liquid Troubleshooting-Handbuch

Sicherheitsdatenblätter (SDS) und Analysenzertifikate (CoA) sind in digitaler Form unter folgendem Link erhältlich

<https://eifu.r-biopharm.com/>



8. Grenzen dieser Methode

Die Testergebnisse können in Abhängigkeit von der Probenmatrix, der individuellen Testdurchführung und der Laborumgebung variieren. Die Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen hängen von der jeweiligen Probenmatrix und dem Extraktionsverfahren ab. Detaillierte Ergebnisse und weitere Informationen entnehmen Sie bitte dem aktuellen Validierungsbericht.

Für den vorliegenden Enzymtest konnten aufgrund der großen Anzahl von Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien nur angegebene, beispielhafte Matrices validiert werden.

Bei der Analyse einer nicht-validierten Matrix wird empfohlen, die erzielten Ergebnisse durch Dotierexperimente zu verifizieren. Falls erforderlich, muss eine geeignete Probenvorbereitung für die betreffende Probenmatrix erarbeitet und ggf. validiert werden.

9. Dienstleistungen & technischer Support

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Leistungen:

- Kundenspezifisches Troubleshooting
- Daten- & Ergebnisanalyse
- Kunden-Workshops & Webinare
- Automatisierung: applikativer Support und technischer Service

10. 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.