

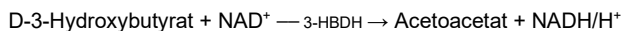
Enzymatischer UV-Test zur Bestimmung von D-3-Hydroxybuttersäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien Nur für den Laborgebrauch  
Test-Kombination für 50 Bestimmungen Lagerung bei 2 - 8 °C

Dieser Test wurde für die folgenden Matrices getestet und validiert: Flüssig-Vollei, Volleipulver und Nudeln. Detaillierte Ergebnisse und weitere Informationen zu den Validierungsdaten finden Sie im Validierungsbericht.

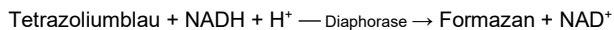
Andere Lebensmittel oder Probenmaterialien können getestet werden und müssen vom Anwender validiert werden.

## 1. Testprinzip

D-3-Hydroxybuttersäure respektive D-3-Hydroxybutyrat wird durch Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD<sup>+</sup>) in Gegenwart des Enzyms 3-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase (3-HBDH) zu Acetoacetat umgesetzt, wobei NAD<sup>+</sup> zu NADH reduziert wird:



Tetrazoliumblau (Tetrazoliumchlorid, TTC) wird in Gegenwart einer Diaphorase und dem entstandenen NADH/H<sup>+</sup> zu Formazan reduziert, wobei NADH wieder zu NAD<sup>+</sup> oxidiert wird:



Die Menge des gebildeten Formazans ist äquimolar zur Konzentration der umgesetzten D-3-Hydroxybuttersäure. Formazan wird aufgrund seiner spezifischen Absorption bei einer Wellenlänge von **492 nm** gemessen.

## 2. Reagenzien

### 2.1. Inhalt & Zusammensetzung

Der Test ist für eine manuelle und automatisierte Abarbeitung geeignet. Die Reagenzien reichen für 50 Bestimmungen bei manueller Abarbeitung. Die Anzahl der Bestimmungen bei automatisierter Abarbeitung ist um ein Vielfaches erhöht, jedoch geräteabhängig. Die Inkubationszeiten bei automatisierter Abarbeitung können ggf. abweichen und müssen daher verifiziert werden.

- Reagenz 1 2 x 50 ml Puffer, 3-HBDH, Diaphorase
- Reagenz 2 2 x 12,5 ml Puffer, Tetrazoliumblau, NAD

### 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 zum aufgedruckten Haltbarkeitsdatum stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren.

**Hinweis:** Tetrazoliumblau (Tetrazoliumchlorid) ist lichtempfindlich und sollte während der Testdurchführung weitestgehend und bei Lagerung stets vor Licht geschützt werden.

### 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. Allgemein

- Die Probenvorbereitung für die manuelle und die automatisierte Testdurchführung ist identisch.
- Proben vor der Messung auf Raumtemperatur bringen.
- Flüssige, klare und annähernd neutrale Probelösungen direkt bzw. nach Verdünnen mit dest. Wasser auf eine Konzentration **im Messbereich (siehe Leistungsdaten)** im Test einsetzen.
- Trübe Lösungen mittels Falten- oder Spritzenfilter filtrieren, um eine klare Testlösung zu erhalten. Alternativ mindestens 5 Minuten bei 3000 g zentrifugieren, bis ein klarer Überstand erhalten wird.
- Kohlensäurehaltige Proben entgasen, z.B. durch Filtrieren oder Zentrifugieren.
- Stark gefärbte und hochkonzentrierte Proben sollten mit Polyvinylpyrrolidon (PVPP) entfärbt werden.
- Feste und halb feste Proben ausreichend homogenisieren und zerkleinern; mit Wasser extrahieren oder in dest. Wasser auflösen und ggf. filtrieren.
- Stark fetthaltige Proben in einen Messkolben einwiegen und mit heißem Wasser extrahieren; Probelösung zur Fettabscheidung abkühlen lassen (z.B. 15 min im Eisbad); Messkolben bis zur Marke mit Wasser auffüllen und vor dem Testen filtrieren.

### 3.2. Vereinfachte Extraktion mit PEG 8000 (empfohlen)

Zur Bestimmung von D-3-Hydroxybuttersäure in Flüssig-Vollei und Vollei-Pulver wird im Folgenden eine **vereinfachte Extraktion mit PEG 8000** zur Präzipitation von Proteinen und Fetten durch Emulsionstrennung und Aussalzungseffekten empfohlen, was in einer klaren, wässrigen Lösung resultiert.

Beachten Sie hierzu auch den Abschnitt 5.2. *Hinweis zur Berechnung bei Extraktion mit PEG 8000.*

#### 3.2.1. Bestimmung von D-3-Hydroxybuttersäure in Flüssig-Vollei nach Extraktion mit PEG 8000

- Etwa 10 g homogenisiertes flüssiges Vollei in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (alternativ: Messkolben) **genau** einwiegen.
- 1,4 g PEG 8000 hinzugeben, PEG durch manuelles Schütteln lösen und anschließend 10 min z.B. auf einem automatischen Vortexer mischen.
- Bei 3000 g für 10 min zentrifugieren, anschließend 1 - 3 ml des klaren Überstands (feste Partikel vermeiden!) in ein neues Röhrchen überführen.
- Anschließend 100 µl Probelösung im Test einsetzen.
- Diesen Extrakt nicht länger als 12 Stunden aufbewahren.

#### 3.2.2. Bestimmung von D-3-Hydroxybuttersäure in Vollei-Pulver nach Extraktion mit PEG 8000

- Etwa 2,5 g Vollei-Pulver in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (alternativ: Messkolben) **genau** einwiegen.
- 7,5 g dest. Wasser hinzugeben, 15 Sekunden manuell schütteln und anschließend weitere 10 Sekunden vortexen, um das Eipulver zu rekonstituieren.
- 1,4 g PEG 8000 hinzugeben, PEG durch manuelles Schütteln lösen und anschließend 10 min z.B. auf einem automatischen Vortexer mischen.
- Bei 3000 g für 10 min zentrifugieren, anschließend 1 - 3 ml des klaren Überstands (feste Partikel vermeiden!) in ein neues Röhrchen überführen.
- Anschließend 100 µl Probelösung im Test einsetzen.
- Diesen Extrakt nicht länger als 12 Stunden aufbewahren.

### 3.3. Bestimmung von D-3-Hydroxybuttersäure in Nudeln

- Etwa 1 g homogenisierte Nudeln in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (alternativ: Messkolben) **genau** einwiegen.
- 12 ml dest. Wasser und 1 Tropfen *n*-Octanol hinzufügen, mischen und 15 Minuten in einem Wasserbad bei ca. 100 °C inkubieren.
- Anschließend auf 20 - 25 °C abkühlen lassen.

- 1 ml **konzentrierte** Carrez-I-Lösung (155 g/l Kalium-hexacyanoferrat (II) Trihydrat) hinzugeben und kräftig schwenken.
- 1 ml **konzentrierte** Carrez-II-Lösung (300 g/l Zinksulfat Heptahydrat) hinzugeben und kräftig schwenken.
- Mit 1 M NaOH auf pH 8 - 9 einstellen.
- Quantitativ in einen Messkolben überführen und mit dest. Wasser bis zur 25 ml Marke auffüllen.
- Lösung bei 3000 g für 2 min zentrifugieren, anschließend den klaren Überstand durch einen Falten- oder Spritzenfilter filtrieren.
- Anschließend 100 µl bis maximal 500 µl Probelösung im Test einsetzen.

**4. Testdurchführung**

Wellenlänge: 492 nm  
 Temperatur: 20 - 37 °C (während der Messung)  
 Photometer-Abgleich: gegen Luft (ohne Küvette)  
 Messbereich: 0,5 - 50 mg/l (bei 100 µl Probe)

	Reagenzleerwert	Probe / Kontrolle
<b>Reagenz 1</b>	2000 µl	2000 µl
<b>Probe / Kontrolle</b>	-	100 µl
<b>Dest. Wasser</b>	100 µl	-
Mischen, 3 min bei 20 - 37 °C inkubieren. Extinktion E <sub>1</sub> bei 492 nm messen, dann Zugabe von:		
<b>Reagenz 2</b>	500 µl	500 µl
Mischen, 15 min bei 20 - 37 °C inkubieren, Extinktion E <sub>2</sub> bei 492 nm messen.		

- Der Reagenzleerwert (RLW) muss bei jedem Lauf **einmalig** mitbestimmt und von jedem Probenergebnis abgezogen werden.
- Reagenzleerwert und Probe müssen **im selben Lauf** und unter gleichen Bedingungen gemessen werden.
- Zur Steigerung der Sensitivität ist eine Erhöhung des Probenvolumens bis zu 1000 µl (siehe Validierungsbericht) bei **unveränderten** Reagenzvolumina möglich.
- Das Volumen des Reagenzleerwertes ist dem veränderten Probenvolumen anzupassen.
- Bei Erhöhung des Probenvolumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es dies Matrix-abhängig zu überprüfen.

**4.1. Wichtige Hinweise zur Testdurchführung**

- Die angegebenen Inkubationszeiten können je nach vorherrschenden Laborbedingungen und abhängig von der Pipettiergenauigkeit variieren. Es wird daher empfohlen bei den ersten Durchläufen das Ende der Reaktion abzuwarten und die Zeiten ggf. anzupassen.
- Falls die Reaktion nach der angegebenen Inkubationszeit nicht zum Stillstand gekommen ist, sollten die Extinktionen in 2-Minuten-Abständen weiter gemessen werden, bis eine konstante Extinktionszunahme pro 2 min erreicht wird. Wurden konstante Extinktionszunahmen festgestellt, so werden die Extinktionen E<sub>2</sub> auf die Zeit der Zugabe von Reagenz 2 extrapoliert.
- Zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses sollten die gemessenen Extinktionsdifferenzen üblicherweise mindestens 0,050-0,100 Extinktionseinheiten betragen.
- Für die Zugabe der Reagenzien wird die Verwendung einer Multistepper-Pipette empfohlen. Verwenden Sie für jede Komponente eine separate Spitze und spülen Sie die Spitze vor dem Pipettieren.
- Zur Durchmischung empfiehlt sich die Verwendung von Rührspateln für jede einzelne Küvette. Diesen erst unmittelbar vor den Extinktionsmessungen aus der Küvette nehmen.
- Ist die gemessene Extinktionsdifferenz zu klein (z.B. ΔE < 0,02), so ist das Probenvolumen (v) bis auf maximal 1000 µl zu erhöhen oder die Probelösung erneut herzustellen (höhere Einwaage oder weniger starke Verdünnung).
- Das Volumen der Wassermenge des Reagenzleerwertes ist in diesem Fall entsprechend anzupassen, so dass in allen das gleiche Testvolumen vorliegt. Das geänderte Probenvolumen ist in den Berechnungsformeln entsprechend einzusetzen.

**5. Berechnung der Ergebnisse**

**5.1. Berechnung bei Probelösungen**

**5.1.1. Gesamtkonzentration D-3-Hydroxybuttersäure**

Es gilt die Extinktionsdifferenz ΔE für jede Probe zu berechnen:

$$\Delta E = (E_2 - E_1 \times df)_{\text{Probe oder Kontrolle}} - (E_2 - E_1 \times df)_{\text{RLW}}$$

df: Dilution factor (Reagenzverdünungsfaktor)  
 RLW: Reagenzleerwert

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

Der angegebene df-Wert von 0,808 gilt für eine Basisapplikation von 100 µl. **Die Erhöhung des Probenvolumens erfordert die Umrechnung des Reagenzverdünungsfaktors (df).**

Die Berechnung der D-3-Hydroxybuttersäure-Konzentration erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$C_{\text{D-3-Hydroxybuttersäure}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MG \times \Delta E)}{(\epsilon \times d \times v \times 1000)} = 0,1512 \times \Delta E (\times F)$$

V: Testvolumen (Basisapplikation) [ml] = 2,6  
 MG: Molekulargewicht D-3-Hydroxybuttersäure [g/mol] = 104,1  
 d: Schichtdicke [cm] = 1,0  
 v: Probevolumen (Basisapplikation) [ml] = 0,1  
 ε: Extinktionskoeffizient Formazan [L/(mmol x cm)] = 17,9 (bei 492 nm)

Wurde die Probenlösung vor der Messung verdünnt, muss dieses Ergebnis mit dem **Vorverdünungsfaktor F** multipliziert werden.

**5.2. Hinweis zur Berechnung bei Extraktion mit PEG 8000**

Da Flüssig-Vollei ungefähr 25 % Proteine und Fett enthält, muss ein Konzentrationsfaktor bei der Berechnung berücksichtigt werden:

10 g flüssiges Vollei enthalten 2,5 g ausfallende Feststoffe durch Zugabe von 1,4 g PEG 8000, das in der wässrigen Phase gelöst wird. Nach der Ausfällung beträgt die theoretische Flüssigkeitsmenge 10 g + 1,4 g - 2,5 g = 8,9 g. Der Konzentrationsfaktor beträgt 10 g / 8,9 g = 1,12. Die gleiche Berechnung gilt für Volleipulver, das vor der Extraktion durch Zugabe von Wasser rekonstituiert wird.

**5.3. Berechnung bei Feststoffen**

Bei der Analyse fester und halbfester Proben, die für die Extraktion der Probe eingewogen werden müssen, wird der Gehalt auf die Einwaage bezogen:

$$\text{Gehalt}_{\text{D-3-Hydroxybutters.}} [\text{g}/100 \text{ g}] = \frac{C_{\text{D-3-Hydroxybutters.}} [\text{g/l Probelösung}]}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ in g/l Probelösung}} \times 100$$

**Beispiel:**

$$C_{\text{D-3-Hydroxybuttersäure}} = 0,454 \text{ g/l Einwaage} = 5,02 \text{ g}/100 \text{ ml} \triangleq 50,2 \text{ g/l}$$

$$\text{Gehalt}_{\text{D-3-Hydroxybuttersäure}} = \frac{0,454 \text{ g/l}}{50,2 \text{ g/l}} \times 100 = 0,904 \text{ g}/100 \text{ g (oder \%)}$$

**5.4. 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:

- Enzytec™ Liquid Multi-acid Standard 2 low (E8470) mit 0,05 g/l D-3-Hydroxybuttersäure direkt als Kontrolle einsetzen.

## 6. Leistungsdaten

### 6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

Die D-3-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase (3-HBDH) ist spezifisch für D-3-Hydroxybuttersäure.

L-Ascorbinsäure und SO<sub>2</sub> als typische redox-reaktive, sowie L-3-Hydroxybuttersäure (S-3-Hydroxybuttersäure), Carnitin und 3-Hydroxyglutarsäure als strukturähnliche Substanzen zu D-HBA wurden analysiert. Außer L-Ascorbinsäure zeigte keine Substanz relevante ΔE-Werte von mehr als 0,002.

### 6.2. Interferenzen

Isocitronensäure und L-Weinsäure zeigten bis Konzentrationen von 2,5 g/l keine Interferenzen.

Natriumsulfit führt zu leicht erhöhten Signalen für D-3-Hydroxybuttersäure bei Konzentrationen von 1,25 g/l und darüber.

Für relevante Zucker und organische Säuren konnten bei Konzentrationen von 5 g/l und 10 g/l keine Interferenzen identifiziert werden.

### 6.3. Linearität, Messbereich & Sensitivität

Bei einem Probenvolumen von 100 µl ist die Linearität bis 50 mg/l D-3-Hydroxybuttersäure gegeben. Der empfohlene Messbereich für 100 µl liegt bei 0,5 - 50 mg/l bzw. bei 0,15 - 2 mg/l für 1000 µl Probenvolumen.

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde nach der Methode DIN 32645:2008-11 in stabilisierter wässriger Lösung bestimmt. Daraus ergibt sich ein LoD von 0,16 mg/l D-3-Hydroxybuttersäure für ein Probenvolumen von 100 µl und 0,015 mg/l für 1000 µl Probenvolumen.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde anhand eines Präzisionsprofils bestimmt und bestätigt eine Konzentration von 0,5 mg/l für 100 µl und 0,05 mg/l für 1000 µl Probenvolumen.

## 7. Unterstützende Dokumente

Auf Anfrage bieten wir Ihnen folgende Dokumente:

- Enzytec™ Liquid Validierungsberichte
- Enzytec™ Liquid Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ Liquid Excel-Auswertevorlagen
- Enzytec™ Liquid Technische Informationen
- 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.