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 mit ausgewählten Proben der folgenden Matrices geprüft: Flüssig-Vollei, Volleipulver und Nudeln.

Detaillierte Ergebnisse und weitere Informationen zu den entsprechenden Validierungsdaten sind dem Validierungsbericht zu entnehmen.

Der Test kann auch mit anderen Lebensmitteln oder Probenmaterialien verwendet werden, sofern diese einer individuellen Validierung durch den Anwender unterzogen werden.

1. Testprinzip

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

D-3-Hydroxybutyrat + NAD^+ —$_{3\text{-HBDH}}$→ Acetoacetat + $NADH/H^+$

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

Tetrazoliumblau + NADH + H^+ —$_{\text{Diaphorase}}$→ Formazan + NAD^+

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 bei manueller Abarbeitung für 50 Bestimmungen. Die Anzahl der Bestimmungen bei automatisierter Abarbeitung ist um ein Vielfaches erhöht, jedoch geräteabhängig.

- Reagenz 1: 2 x 50 ml mit Puffer, 3-HBDH, Diaphorase
- Reagenz 2: 2 x 12,5 ml mit 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 zur aufgedruckten Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien nicht einfrieren.

2.4. Sicherheit & Entsorgung

Der Test ist ausschließlich für den in der Zweckbestimmung beschriebenen Einsatz vorgesehen. Die Gebrauchsanweisung ist strikt zu befolgen.

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Chemikalien sind anzuwenden. Das Produkt darf nicht verschluckt werden. Berührung mit Haut und Schleimhäuten ist zu vermeiden.

Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten sind den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (SDS) zu entnehmen.

Nach Gebrauch sind die Reagenzien gemäß den geltenden Vorschriften als Laborabfall zu entsorgen. Das Verpackungsmaterial ist dem Recycling zuzuführen.

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 destilliertem 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 Rühren in einem Becherglas, Filtrieren oder Zentrifugieren.
- Stark gefärbte und hochkonzentrierte Proben sollten mit Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) entfärbt werden.
- Feste und halbfeste 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 Minuten 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 Minuten 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 Minuten zentrifugieren, anschließend den klaren Überstands durch einen Falten- oder Spritzenfilter filtrieren.
- Anschließend 100 µl bis maximal 500 µl Probelösung im Test einsetzen.

4. Manuelle Testdurchführung

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

	Reagenzleerwert	**Probe / Kontrolle**
Reagenz 1	2000 µl	2000 µl
Probe / Kontrolle	-	100 µl
Dest. Wasser	100 µl	-
Mischen, **3 Minuten bei 20 – 37 °C** inkubieren. Extinktion **E_1** bei **492 nm messen**, dann Zugabe von:		
Reagenz 2	500 µl	500 µl
Mischen, **15 Minuten bei 20 – 37 °C** inkubieren, Extinktion **E_2** bei **492 nm messen**.		

4.1. Wichtige Hinweise zur Testdurchführung

- Der Reagenzleerwert (Wasserprobe) **muss in jeder Messserie** mitbestimmt und von **jedem** Probenergebnis abgezogen werden.
- Reagenzleerwert und Probe müssen **im selben Lauf** und unter gleichen Bedingungen gemessen werden.
- Die angegebenen Inkubationszeiten wurden bei 37 °C validiert und festgelegt. Die Durchführung des Tests ist grundsätzlich auch im Temperaturbereich von **20 – 37 °C** möglich.
- Verwenden Sie für jeden Probenextrakt und die Kontrolllösungen separate Spitzen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden; spülen Sie die Spitze vor dem Pipettieren.
- Für die Zugabe der Reagenzien wird die Verwendung einer Multistepper-Pipette empfohlen. Verwenden Sie für jede Komponente eine separate Spitze.
- Zur Durchmischung empfiehlt sich die Verwendung von Rührspateln für jede einzelne Küvette. Diese erst unmittelbar vor den Extinktionsmessungen aus der Küvette nehmen.
- Das Ende der Reaktion bzw. ein Stillstand der Extinktionen sollte (zumindest bei den ersten Testdurchläufen bzw. der Validierung) stets abgewartet werden. Ist die Extinktion nach der empfohlenen Inkubationszeit nicht zum Stillstand gekommen, sollte weiter in bspw. 2- oder 5-Minuten-Abständen gemessen werden, bis ein konstanter Extinktionswert erreicht ist.
- Sollte eine Schleichreaktion auftreten, ist die Reaktion nach den angegebenen Inkubationszeiten noch nicht abgeschlossen und zeigt in der Regel einen konstanten Anstieg von ΔE. Berechnen Sie den analyt-spezifischen ΔE-Wert, indem Sie die Absorptionswerte gegen die Zeit auftragen und eine lineare Regression durchführen, um die Anstiegsrate von ΔE pro Minute in Relation zur Schleichreaktion zu bestimmen. Extrapolieren Sie dann die Absorption auf den Zeitpunkt der Reagenz-2-Zugabe.
- Ist die gemessene Extinktionsdifferenz der Proben zu klein (< 0,020), so ist die Probelösung mit höherer Einwaage oder weniger starker Verdünnung erneut herzustellen.
- Ist die Extinktionsdifferenz der Proben sehr groß (bspw. > 1,500), so ist die Probelösung gegebenenfalls zu verdünnen.

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 (Reagenzverdünnungsfaktor)
RLW: Reagenzleerwert

$$df = \frac{\text{Probenvolumen + Volumen R1}}{\text{Testvolumen}} = \mathbf{0{,}808}$$

Der angegebene df-Wert von **0,808 gilt für eine Basisapplikation von 100 µl**. Eine Erhöhung des Probenvolumens ist möglich (max. 1000 µl; siehe Validierungsbericht). **Bei gleichbleibenden Reagenzvolumina** erfordert dies die **Umrechnung des Reagenz-verdünnungsfaktors (df)**.

Bei Erhöhung des Probenvolumens kann es zur Beeinflussung des Testsystems kommen. Generell gilt es, dies matrix-abhängig zu überprüfen. **Der Reagenzleerwert ist dem veränderten Probenvolumen anzupassen.**

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

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

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

V:	Testvolumen (Basisapplikation) [ml]	= 2,6
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)

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:

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

Beispiel:

$C_{\text{D-3-Hydroxybuttersäure}}$ = 0,454 g/l Einwaage = 5,02 g/100 ml ≙ 50,2 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. Hierfür empfehlen wir den Enzytec™ *Liquid* Multi-Acid Standard low (Art. Nr. E8470; 0,050 g/l D-3-Hydroxybuttersäure).

Die Wiederfindung des Multi-Standards *low* sowie anderen *wässrigen* Kontrolllösungen sollte bei 100 ± 5 % liegen.

6. Leistungsdaten

6.1. Spezifität & Nebenaktivitäten

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

L-Ascorbinsäure und SO_2 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* D-3-Hydroxybuttersäure Validierungsbericht
- Enzytec™ *Liquid* Probenvorbereitungshandbuch
- Enzytec™ *Liquid* D-3-Hydroxybuttersäure Excel-Auswertevorlage
- Enzytec™ *Liquid* D-3-Hydroxybuttersäure Technische Information
- 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 den Umgebungsbedingungen im Labor variieren. Die Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen hängen von der jeweiligen Probenmatrix und dem Extraktions-verfahren ab. Detaillierte Informationen entnehmen Sie bitte dem aktuellen Validierungsbericht.

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

Bei der Analyse einer nicht-validierten Matrix wird empfohlen, die erzielten Ergebnisse durch Dotierexperimente zu überprüfen. Falls erforderlich, ist eine geeignete Probenvorbereitung für die betreffende Probenmatrix zu entwickeln und ggf. zu validieren.

Die Verantwortung für die Validierung nicht geprüfter Matrizes sowie für die Sicherstellung der Eignung des Tests für den vorgesehenen Zweck liegt ausschließlich beim Anwender.

9. Dienstleistungen & technischer Support

Auf Anfrage bieten wir Ihnen u.a. folgende Dienstleistungen:

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

10. Haftungsausschluss

Diese Angaben entsprechen dem aktuellen Stand unserer Kenntnisse und dienen ausschließlich der Information über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten. Sie stellen keine Zusicherung bestimmter Eigenschaften oder deren Eignung für einen konkreten Verwendungszweck dar.

R-Biopharm AG leistet für Sach- und Rechtsmängel über einen Zeitraum von 12 Monaten (bzw. im Falle von Produkten, die eine kürzere Haltbarkeit haben, bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums oder bei limitierter Verwendung bis zum Erreichen der Anzahl der Verwendungen) Gewähr, gerechnet vom Tag des Gefahrübergangs, vorbehaltlich einer frist- und formgerechten Rüge durch den Kunden, wobei die vereinbarte Beschaffenheit und Eignung für die vertraglich vorausgesetzte Verwendung und Übergabe mit vereinbartem Zubehör und vereinbarten Anleitungen („subjektiven Anforderungen“) entscheiden, ob eine Sache mangelhaft ist.

Die R-Biopharm AG übernimmt keine Gewährleistung für Folgen aus der Versäumnis

a. Die Gebrauchs- oder Sicherheitsanweisungen eines Produktes zu lesen, zu verstehen oder zu befolgen;
b. geschultes und qualifiziertes Personal für das Produkt einzusetzen;
c. geeignete Industriestandards- und Praktiken anzuwenden, insbesondere Good Laboratory Practices;
d. für das Produkt geeignete Kontroll-/Proben-/Probenmatrices oder Abarbeitungsverfahren/Prozesse einzusetzen und dies, soweit erforderlich, zu überprüfen;
e. sonstige fehlerhafte Benutzung;
f. Veränderung oder Bearbeitungen der Produkte
g. unsachgemäße Lagerung durch den Kunden oder Dritte
h. Folgen chemischer, elektromagnetischer, mechanischer oder elektrolytischer Einflüsse außerhalb der von R-Biopharm AG dokumentierten Standardbereiche
i. Schäden und Störungen, die durch von R-Biopharm nicht zu vertretende äußere Einwirkungen entstanden sind (z.B. Einbruch, Diebstahl, Blitzschlag, Feuer, Wasser, höhere Gewalt).

R-Biopharm AG haftet für Arglist, grobe Fahrlässigkeit oder Vorsatz der R-Biopharm AG, Verletzung von Leib, Leben oder Gesundheit, der Übernahme einer Garantie, eines Beschaffungsrisikos nach § 276 BGB oder einer Haftung nach einem anderen gesetzlich zwingenden Haftungstatbestand.

Die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung wesentlicher Vertragspflichten (Pflichten, die für die Erreichung des Vertragszwecks wesentlich sind und auf deren Einhaltung der Vertragspartner regelmäßig vertrauen darf) ist auf den vertragstypisch vorhersehbaren Schaden begrenzt; die Haftung der R-Biopharm AG für die leicht fahrlässige Verletzung anderer Pflichtverletzungen ist ausgeschlossen.

ALLE WEITEREN AUSDRÜCKLICHEN ODER STILLSCHWEIGENDEN GEWÄHRLEISTUNGEN ODER GARANTIEN JEGLICHER ART SIND AUSGESCHLOSSEN, UNABHÄNGIG DAVON, OB SIE SICH AUS GEPFLOGENHEITEN, GESCHÄFTSPRAKTIKEN, DEM GESCHÄFTSVERLAUF ZWISCHEN DEN PARTEIEN ODER ANDEREN UMSTÄNDEN ERGEBEN.
Die R-Biopharm AG übernimmt keine Haftung für Folgeschäden, insbesondere entgangenen Gewinn, Produktionsrückstände oder sonstige mittelbare Schäden.