

Enzymatische UV-Bestimmung von D-3-Hydroxybuttersäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien  
(33 Tests manuell / 330 Tests mittels Auto-Analysegerät)

Nur für den Laborgebrauch  
Lagerung bei 2 - 8 °C

## Testprinzip

Die β-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (β-HB-DH) katalysiert die Oxidation von D-3-Hydroxybutyrat zu Acetoacetat bei gleichzeitiger Reduktion von NAD zu NADH, die bei 340 nm gemessen wird:



## Reagenzien

- #1: R1-Puffer (Good-Puffer, pH > 7,5): 2 Fläschchen mit je ~50 ml
- #2: R2-NAD (NAD > 250 mol/l): 10 Fläschchen mit je ~10 ml
- #3: R3-β-HB-DH (β-HB-DH > 50 KU/l, Aktivatoren, Stabilisatoren): 1 Fläschchen mit ~20 ml (gebrauchsfertig)
- #4: R4-QC (β-Hydroxybutyrat 500 mg/l, NaN3 < 0,1%): 1 Fläschchen mit ~5 ml

Die Reagenzien sind bei 2 - 8 °C bis zum Monatsende der Haltbarkeit stabil (siehe Etikett). Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Chemikalien sollten beachtet werden. Nicht verschlucken! Berührung mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.

Dieses Kit kann gesundheitsgefährdende Substanzen enthalten. Sicherheitshinweise zu den enthaltenen Komponenten sind den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (MSDS) auf unserer Internetseite ([www.r-biopharm.de](http://www.r-biopharm.de)) zu entnehmen. Nach Gebrauch die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgen. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

## Herstellen der Arbeitslösungen

Ein Fläschchen R2-NAD mit 10 ml R1-Puffer auflösen. Gleichmäßig mischen bis sich der Inhalt aufgelöst hat. Vermeiden Sie die Bildung von Schaum. Bringen Sie das Reagenz vor Gebrauch auf Raumtemperatur. Nach Gebrauch sofort verschließen.

Stabilität der Arbeitslösungen: 7 Tage bei 2 - 8 °C.

## Probenvorbereitung

- Flüssige, klare und nahezu neutrale Proben direkt oder nach Verdünnung in den jeweiligen Messbereich verwenden (siehe Testdurchführung)
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren
- Falls nötig, allgemein Probenvorbereitungsmethoden für enzymatische Analysen verwenden (bspw. Wasserextraktion, Carrez-Klärung, Deproteinisierung mit Säuren, etc.)

## Testdurchführung

Wellenlänge: 340 nm  
Schichtdicke: 1 cm (Glas, Kunststoff)  
Temperatur: 37 °C  
Methode: End-Punkt  
Linearität: bis zu 800 mg/l

	Reagenzienleerwert	Probe
Reagenz R2-NAD	3000 µl	3000 µl
Probe / Standard	-	50 µl
Dest. Wasser	50 µl	-
Mit einem Spatel mischen und für ca. 3 min bei 37 °C inkubieren. Extinktion E <sub>1</sub> ablesen, dann zugeben:		
R3 β-HB-DH	500 µl	500 µl
Mit einem Spatel mischen, genau 15 min bei 37 °C inkubieren und Extinktion E <sub>2</sub> ablesen. Exakt weitere 5 min warten und Extinktion E <sub>3</sub> ablesen.		

## Berechnung der Ergebnisse

### Option 1: nach Lambert-Beer'schem Gesetz

Berechnen Sie die Extinktionsdifferenz (ΔE) für den Reagenzienleerwert und für die Proben:

$$\Delta E = (E_2 - df \times E_1) - 3(E_3 - E_2)$$

*df (dilution factor) = Reagenzverdünnungsfaktor, der sich für die Extinktion durch das im Test zugegebene Reagenzvolumen ergibt:*

$$df = (\text{Probenvolumen} + R1) / (\text{Probenvolumen} + R1 + R2)$$

$$= 3050 / 3550 = 0.859$$

- Die Differenz E<sub>3</sub> - E<sub>2</sub> stellt die Schleichreaktion dar und wird von der Gesamtreaktion, die während den ersten 15 Minuten gemessen wird, subtrahiert.

Ziehen Sie den Reagenzienleerwert von jeder Probe ab und berechnen Sie die Konzentration.

$$\Delta E_{\beta\text{-Hydroxybuttersäure}} = \Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Reagenzienleerwert}}$$

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

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

$$c = 1,1732 \times \Delta E \text{ [g/l]} \quad (\text{bei } 340 \text{ nm})$$

Diese Methode ermöglicht es, den Standard (Flasche 4) als Qualitätskontrolle statt als Kalibrator zu verwenden.

### Option 2: mittels Kalibrierkurve

Berechnen Sie ΔE<sub>Standard</sub> für jeden Kalibrierpunkt und ΔE<sub>Probe</sub> für jede Probe. Erstellen Sie die Kalibrierkurve unter Verwendung der Konzentration und des ΔE<sub>Standard</sub> jedes Kalibrierpunktes.

Die Kalibrierkurve muss bei einem Wechsel des Kits, der Chargen oder des Kalibrators wiederholt werden. Lesen Sie ΔE<sub>Probe</sub> für jede Probe auf der Kalibrierkurve ab und geben Sie die Konzentration an.

### Weitere Berechnungen:

Falls die Probe verdünnt wurde, multiplizieren Sie das Ergebnis mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor.

Berechnung bei Feststoffen nach der Extraktion mit Wasser:

$$\text{Gehalt [g/100 g]} = \frac{C \text{ [g/l]}}{\text{Einwaage}_{\text{Extraktion}} \text{ [g/l]}} \times 100$$

## Leistungsdaten

1. Es wurden keine Interferenzen identifiziert.
2. **Linearität:** Die Linearität ist bis 800 mg/l gegeben. Für höhere Konzentrationen: Verdünnen Sie die Probe mit destilliertem Wasser, wiederholen Sie den Test und multiplizieren das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor.
3. **Sensitivität (LoD):** Die Nachweisgrenze, die sich statistisch von Null unterscheidet, liegt bei 0,6 mg/l.
4. Applikationen für Auto-Analysegeräte sind auf Anfrage erhältlich.

## Literatur

1. Methods of Enzymatic Analysis, Ed. By H.U.Bergmeyer, 3rd ed., Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florid Basel (1985).
2. Council Directive (20 June 1989), Official Journal N. I212/87 (89/437/EEC)(1989)
3. Parry A.E.J. et al., J. Sci. Food Agric. 31, 905 (1980)

## 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.