

# D-3-Hydroxybuttersäure

## Farb-Test

zur Bestimmung von D-3-Hydroxybuttersäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien

**Best. Nr. 10 907 979 035**

Test-Combination für 3 × ca. 12 Bestimmungen

**BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM**  
Enzymatische BioAnalytik / Lebensmittelanalytik

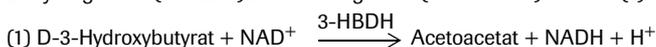
Nur zur Verwendung in der Lebensmittelhygiene.

**Lagern bei 2-8°C**

Methoden-Empfehlungen und standardisierte Verfahren siehe unter Literatur (2)

### Prinzip (Lit. 1)

D-3-Hydroxybuttersäure (D-3-Hydroxybutyrat) wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) in Gegenwart des Enzyms 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (3-HBDH) zu Acetessigsäure (Acetoacetat) oxidiert (1).



Das hierbei entstehende NADH setzt Jodnitrotetrazoliumchlorid (INT) in Gegenwart von Diaphorase zu einem Formazan um, welches im sichtbaren Bereich im Maximum bei 492 nm gemessen wird (2).



Das Gleichgewicht der Reaktion (1) wird durch Abfangen des gebildeten NADH durch INT (2) quantitativ auf die Seite von Acetoacetat verschoben.

### Die Test-Combination enthält

- Flasche 1 mit ca. 25 ml Lösung, zusammengesetzt aus:  
Kaliumphosphat/Triethanolamin-Puffer, pH ca. 8,6; Polidocanol.
- Drei Flaschen 2 mit je ca. 35 mg Lyophilisat, zusammengesetzt aus:  
Diaphorase, ca. 4 U; NAD, ca. 28 mg
- Flasche 3 mit Jodnitrotetrazoliumchlorid-Lösung, ca. 2,5 ml
- Flasche 4 mit ca. 1,8 ml 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase-Suspension, ca. 27 U

### Herstellung der Lösungen

- Inhalt der Flasche 1 unverdünnt verwenden.
- Inhalt einer Flasche 2 mit 2,5 ml bidest. Wasser lösen.
- Inhalt der Flasche 3 mit 6 ml bidest. Wasser verdünnen.
- Inhalt der Flasche 4 unverdünnt verwenden.

### Stabilität der Reagenzien

Lösung 1 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Lösung 1 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.

Der Inhalt der Flaschen 2 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Lösung 2 ist bei 2-8°C 1 Woche haltbar.

Lösung 2 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.

Der Inhalt der Flasche 3 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Lösung 3 ist im Dunkeln gelagert bei 2-8°C 3 Monate, bei 20-25°C 1 Monat haltbar.

Lösung 3 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.

Der Inhalt der Flasche 4 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

### Bestimmungsansatz

Wellenlänge: (Hg) 492 nm

Glasküvette<sup>1</sup>: 1,00 cm Schichtdicke

Temperatur: 20-25°C

Testvolumen: 3,050 ml

Messung gegen Luft (im Strahlengang keine Küvette) gegen Wasser oder Leerwert

Probeflösung: 0,4-12 µg D-3-Hydroxybuttersäure/Testansatz<sup>2</sup> (in 0,100-2,000 ml Probevolumen)

| In Küvetten pipettieren  | Leerwert | Probe    |
|--------------------------|----------|----------|
| Lösung 1 <sup>3</sup>    | 0,600 ml | 0,600 ml |
| Lösung 2 <sup>3</sup>    | 0,200 ml | 0,200 ml |
| Lösung 3 <sup>3, 4</sup> | 0,200 ml | 0,200 ml |
| Probeflösung*            | -        | 0,100 ml |
| bidest. Wasser           | 2,000 ml | 1,900 ml |

mischen,\*\* nach 2 min Extinktionen der Lösungen messen (E<sub>1</sub>). Messung nach 2 min wiederholen.

Wenn eine Extinktionsänderung von grösser als 0,010 beobachtet wird, muss die Probe entsprechend Punkt 7.2 (Entfernung reduzierender Verbindungen) vorbehandelt werden. Wird jedoch eine Extinktionsänderung von kleiner als 0,010 beobachtet, so ist eine Vorbehandlung der Probe entsprechend Punkt 7.2 nicht erforderlich, wenn die Reaktion unmittelbar nach der letzten Extinktionsmessung gestartet wird durch Zugabe von

| Suspension 4 | 0,050 ml | 0,050 ml |
|--------------|----------|----------|
|--------------|----------|----------|

mischen,\*\* **genau 20 min** nach Zugabe von Suspension 4 Extinktionen der Lösungen messen (E<sub>2</sub>). Nach weiteren **genau 10 min** Ablesung der Extinktionen wiederholen (E<sub>3</sub>).

\* Vor der Dosierung der Probeflösung Enzymtest-Messpipette bzw. Pipettenspitze der Kolbenhubpipette mit der Probeflösung vorspülen.

\*\* Z.B. mit Rührspatel oder durch Umschwenken nach Verschliessen z.B. mit Parafilm (Warenzeichen der American Can Company, Greenwich, Ct., USA)

Extinktionsdifferenz des Leerwertes:

$$\Delta E_{\text{Leerwert}} = (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}} - 2 \times (E_3 - E_2)_{\text{Leerwert}}$$

Extinktionsdifferenz der Probe:

$$\Delta E_{\text{Probe}} = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - 2 \times (E_3 - E_2)_{\text{Probe}}$$

Extinktionsdifferenz des Leerwertes von Extinktionsdifferenz der Probe abziehen.

$$\Delta E = \Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}$$

Zur Beschleunigung der Messung und Vereinfachung der Berechnung kann bei geringerer Genauigkeit des Ergebnisses auf die Messung von E<sub>3</sub> verzichtet werden. In diesem Fall sind für Leerwert und Probe die Extinktionsdifferenzen (E<sub>2</sub>-E<sub>1</sub>) zu berechnen.

Extinktionsdifferenz des Leerwertes von Extinktionsdifferenz der Probe abziehen.

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

Die gemessene Extinktionsdifferenz sollte zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Extinktionseinheiten betragen (s. "Hinweise zur Testdurchführung" und "Empfindlichkeit und Nachweisgrenze", Pkt. 4).

### Berechnung

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

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

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient von Formazan bei 492 nm:

$$= 19,9 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

Hieraus ergibt sich für D-3-Hydroxybuttersäure

$$c = \frac{3,050 \times 104,1}{19,9 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E = 0,1596 \times \Delta E \text{ [g D-3-Hydroxybuttersäure / l Probeflösung]}$$

Ist bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen worden, muss das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert werden.

1 Anstelle von Glasküvetten sind auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.

2 Siehe Hinweise zur Testdurchführung

3 Bei Serienanalysen können die Lösungen 1, 2 und 3 in geeignetem Umfang gemischt werden. Von dieser Reagenzienmischung (bei 20-25°C im Dunkeln etwa 1 Stunde stabil) 1,000 ml zum Test einsetzen.

4 **INT ist lichtempfindlich. Nach Zugabe von Lösung 3 dürfen die Küvetten nicht im Licht stehen.**



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

$$\text{Gehalt}_{\text{D-3-Hydroxybuttersäure}} = \frac{c_{\text{D-3-Hydroxybuttersäure}} [\text{g/l Probelösung}]}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ in g/l Probelösung}} \times 1000 [\text{g/1000 g}]$$

## 1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Menge an D-3-Hydroxybuttersäure zwischen 0,4 µg und 12 µg betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probelösung soweit zu verdünnen, dass die D-3-Hydroxybuttersäure-Konzentration max. 0, 12 g/l beträgt.

### Verdünnungstabelle

| Geschätzte Menge an D-3-Hydroxybuttersäure im Liter | Verdünnung mit Wasser | Verdünnungsfaktor F |
|---|-----------------------|---------------------|
| < 0,12 g  | –                     | 1                   |
| 0,12-1,2 g  | 1 + 9                 | 10                  |
| 1,2-12 g  | 1 + 99                | 100                 |
| > 12 g  | 1 + 999               | 1000                |

Ist die gemessene Extinktionsdifferenz ( $\Delta E$ ) zu klein (z.B. < 0,100), so ist die Probelösung erneut herzustellen (höhere Einwaage oder weniger starke Verdünnung), oder das in die Küvette zu pipettierende Probevolumen ( $v$ ) ist bis zu 2,000 ml zu erhöhen. In diesem Fall ist das Volumen der hinzuzufügenden Wassermenge entsprechend zu verringern, so dass in den Ansätzen für Probe und Leerwert das gleiche Testvolumen vorliegt. Das geänderte Probevolumen  $v$  ist in der Berechnungsformel entsprechend einzusetzen.

## 2. Technische Hinweise

- Bei Serienanalysen können die Lösungen 1, 2 und 3 vorgemischt werden. Die Mischung ist im Dunkeln aufbewahrt bei 20-25°C ca. 1 Stunde stabil. Zur Bestimmung 1,000 ml des Reagenziengemischs zum Test einsetzen.
- Nach Zugabe von INT (Lösung 3 oder Reagenziengemisch) ist das Reaktionssystem lichtempfindlich (Tages- und Kunstlicht). Die Inkubation muss im Dunkeln erfolgen:
  - Bei Inkubation im Photometer Küvettenraum des Photometers und Lichtweg schliessen.
  - Küvetten mit lichtundurchlässigem Deckel abdecken oder in einem verschliessbaren Schrank aufbewahren.
- Bei der Analytik von Voll-Ei und Voll-Ei-Pulver hat sich die Carrez-Klärung bewährt (s. Lit. 2.1). Die Probelösung kann auch zur Bestimmung von Bernsteinsäure und L-Milchsäure verwendet werden.
- Die Berechnung der Ergebnisse erfolgt üblicherweise als D-3-Hydroxybuttersäure (Molmasse 104,1).
- Freie Hydroxybuttersäure kann nicht zur Herstellung von Testkontroll-Lösungen verwendet werden, da diese nur teilweise umgesetzt wird. Das könnte wie bei der Milchsäure auf die (teilweise) Bildung von Estern zurückzuführen sein. Zur Herstellung von Testkontroll-Lösungen wird die Verwendung z.B. von Natrium-D,L-3-hydroxybutyrat empfohlen.

## 3. Spezifität der Bestimmung (Lit. 1)

Die Bestimmung ist spezifisch für D-3-Hydroxybutyrat.

Bei der Analyse von Reinsubstanz Mono-Natrium-D,L-hydroxybutyrat (Molmasse 126,1) ist mit Ergebnissen von ca. 50% zu rechnen. (Es wird enzymatisch nur die D-Form gemessen.)

## 4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probevolumen  $v = 2,000$  ml einer D-3-Hydroxybuttersäure-Konzentration von 0,04 mg/l Probelösung (bei  $v = 0,100$  ml entsprechend 0,8 mg/l Probelösung).

Die Nachweisgrenze von 0,2 mg D-3-Hydroxybuttersäure/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,020 und dem maximalen Probevolumen  $v = 2,000$  ml.

## 5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von 0,4 µg D-3-Hydroxybuttersäure/Ansatz (0,2 mg D-3-Hydroxybuttersäure/l Probelösung; Probevolumen  $v = 2,000$  ml) bis 12 µg D-3-Hydroxybuttersäure/Ansatz (0,12 g D-3-Hydroxybuttersäure/l; Probevolumen  $v = 0,100$  ml).

## 6. Präzision

Bei einer Doppelbestimmung, ausgehend von einer Probelösung, ist mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,005 bis 0,010 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probevolumen  $v = 0,100$  ml einer Konzentration von ca. 0,8-1,5 mg D-3-Hydroxybuttersäure/l. (Ist bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen worden, ist mit dem Verdünnungsfaktor F zu multiplizieren. Bei einer Einwaage von 1 g Probe/100 ml = 10 g/l sind die zu erwartenden Unterschiede ca. 0,01-0,015 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten veröffentlicht:

Trockenei-Pulver:

$$\begin{aligned} x = 4 \text{ mg/kg} \quad r &= 3,0 \text{ mg/kg} & s_{(r)} &= \pm 1,1 \text{ mg/kg} \\ & R = 4,1 \text{ mg/kg} & s_{(R)} &= \pm 1,5 \text{ mg/kg} \end{aligned} \quad (\text{Lit. 2.1})$$

## 7. Störungen

- Test-Combinationen, die nach Ablauf der Haltbarkeitsfrist gebraucht werden, oder Reagenzienmischungen aus Diaphorase, NAD und INT, die vor ihrer Verwendung über eine Stunde bei 20-25°C aufbewahrt wurden (siehe<sup>3</sup>), verursachen eine verzögerte Reaktion bzw. führen zu einer "Schleichreaktion", die durch Extrapolation von  $E_2$  bei der Berechnung zu berücksichtigen ist.
- Hohe Konzentrationen an reduzierenden Substanzen, z.B. L-Ascorbinsäure oder schweflige Säure, stören den Test, da sie mit INT reagieren. Diese Störung wird durch Vorbehandlung der Probe mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  eliminiert:

Probe in einen 50 ml-Messkolben einwiegen oder einpipettieren, wenn erforderlich nach Verdünnung. Mit Wasser auf ca. 40 ml auffüllen, 0,5 ml KOH (2 M) und 0,01 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%, w/v) zugeben und 10 min bei ca. 70°C inkubieren. Mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 M) auf pH 7-8 einstellen und Lösung auf 20-25°C abkühlen. Messkolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen, filtrieren und Filtrat zum Test einsetzen.

## 8. Erkennen von Störungen

- Ist die Umsetzung von D-3-Hydroxybuttersäure nach der unter "Bestimmungsansatz" angegebenen Zeit beendet, so kann im allgemeinen auf einen störungsfreien Ablauf geschlossen werden.
- Nach Ablauf der Reaktion kann durch Zugabe von D,L-3-Hydroxybutyrat, mono-Natrium-Salz, (qualitativ oder quantitativ) die Reaktion wieder gestartet werden: Die erneute Änderung der Extinktion nach Zugabe des Standardmaterials ist ein Beweis für den störungsfreien Ablauf der Bestimmung.
- Grobe Fehler beim Testansatz und Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können auch erkannt werden, wenn aus einer Probelösung eine Doppelbestimmung mit verschiedenen Probevolumina (z.B. 0,100 ml und 0,200 ml) ausgeführt wird: Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein.  
Bei der Analytik fester Proben wird die Einwägung verschiedener Mengen (z.B. 1 g und 2 g) in 100 ml-Messkolben empfohlen. Bei gleichen Probevolumina für die Testansätze muss Proportionalität zwischen Extinktionsdifferenz und Einwaage gegeben sein.
- Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können weiterhin durch Mitführen eines internen Standards erkannt werden: Neben Probe-, Leerwert- und Standardansatz wird ein weiterer Ansatz mit Probe- und Testkontroll-Lösung analysiert. Aus den ermittelten Extinktionsdifferenzen wird die Wiederfindung berechnet.
- Verluste während der Vorbereitung der Probe können durch Wiederfindungsversuche erkannt werden: Die Probe wird mit und ohne zugesetztem Standardmaterial vorbereitet und anschliessend gemessen. Der Zusatz muss (innerhalb des Analysenfehlers) quantitativ wiedergefunden werden.

## 9. Gefährlichkeit der Reagenzien

Die Reagenzien zur Bestimmung von D-3-Hydroxybuttersäure sind keine gefährlichen Stoffe oder Zubereitungen im Sinne der Gefahrstoffverordnung, des Chemikaliengesetzes oder der EG-Richtlinie 67/548/EWG und deren Änderungs- und Anpassungsrichtlinien. Die beim Umgang mit Chemikalien üblichen Vorsichtsmassnahmen sollten jedoch beachtet werden.

Nach Gebrauch können die Reagenzien unter Beachtung der örtlichen Vorschriften zum Abwasser gegeben werden. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

## 10. Allgemeine Hinweise zur Vorbereitung der Proben

**Flüssige, klare, farblose und annähernd neutrale Proben** direkt, nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle oder mit einem Probevolumen bis 2,000 ml zum Test einsetzen;

**trübe Lösungen** filtrieren;

**Kohlensäure-haltige Proben** (z.B. durch Filtration) entgasen;

**saure Proben** mit Kalilauge oder Natronlauge auf ca. pH 7-8 einstellen;

**feste und halb feste Proben** zerkleinern oder homogenisieren, mit Wasser extrahieren bzw. lösen, wenn nötig filtrieren;

**Protein-haltige Proben** mit Carrez-Reagenzien klären oder mit Perchlorsäure enteiuweissen;

**Fett-haltige Proben** mit heissem Wasser extrahieren (Extraktionstemperatur über dem Schmelzpunkt des jeweiligen Fettes), zur Abscheidung des Fettes abkühlen lassen, Messkolben bis zur Marke auffüllen, 15 min in Eisbad stellen; alternativ nach Extraktion mit heissem Wasser mit Carrez-Reagenzien klären.

### Carrez-Klärung:

Geeignete Probemenge in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, ca. 60 ml bidest. Wasser hinzufügen. Flüssige Probe in einen 100 ml-Messkolben, der ca. 60 ml bidest. Wasser enthält, pipettieren. Anschliessend 5 ml Carrez-I-Lösung (Kalium-hexacyanoferrat(II) (Ferrocyanid) 85 mM = 3,60 g  $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$  ml) und 5 ml Carrez-II-Lösung (Zinksulfat, 250 mM = 7,20 g  $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$  ml) sorgfältig dosieren. Mit Natronlauge (0,1 M; z.B. 10 ml) pH 7,5-8,5 einstellen. Nach jeder Zugabe mischen, Messkolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren.

**Zur Vorbereitung der Probe von Ei und Ei-Produkten s. Pkt. 11 (Anwendungsbeispiele). Hinweis: In der Routine-Analytik hat sich die Carrez-Klärung (mit "konzentrierten Carrez-Lösungen") bewährt. Das Verfahren wurde im Rahmen der Standardisierung von Methoden in Deutschland nach § 64. Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-Gesetz (LMBG) veröffentlicht. Die aus der Carrez-Klärung erhaltene Probelösung kann auch zur Bestimmung von Bernsteinsäure und L-Milchsäure verwendet werden.**

## 11. Anwendungsbeispiele

### Bestimmung von D-3-Hydroxybuttersäure in Vollei

#### a) Vorbereitung der Probe mit Carrez-Klärung (Lit. 2.1)

Ca. 5 g homogenisiertes Vollei in einen 25 ml-Messkolben genau einwiegen, 10 ml bidest. Wasser und 1 Tropfen n-Octanol zugeben, mischen und 15 min in siedendem Wasserbad erhitzen. Kolben auf 20-25°C abkühlen, der Reihe nach zugeben und nach jeder Zugabe kräftig schwenken: 1 ml konzentrierte Carrez-I-Lösung (15,0 g Kaliumhexacyanoferrat(II),  $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$  ml), 1 ml konzentrierte Carrez-II-Lösung (30,0 g Zinksulfat,  $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$  ml). Mit NaOH (0,1 M) bis zur Marke auffüllen, mischen und mit Faltenfilter und Glasrichter filtrieren. Filtrat zum Test einsetzen ( $v = 0,100$  ml bei angebrütetem Ei und  $v = 1,000$  ml bei Frischei).

Die Konzentration der Probe in der Probelösung ( $c_{\text{Probe}}$ ) beträgt ca. 5 g/25 ml, entsprechend ca. 200 g/Liter.

#### Wiederfindungsversuch

Zur Absicherung der Messungen können Wiederfindungsversuche durchgeführt werden. Hierfür wird eine Lösung von D,L-3-Hydroxybutyrat, Mono-Natriumsalz hergestellt: 0,4 g/100 ml im Falle von angebrütetem Ei ( $v = 0,100$  ml) bzw. 0,4 g/l im Falle von Frischei ( $v = 1,000$  ml).

1,000 ml dieser Lösung wird dem homogenisierten Vollei bei der Vorbereitung der Probe mit Carrez-Klärung zugesetzt. Das zuzusetzende Wasservolumen ist entsprechend zu reduzieren (9 ml statt 10 ml).

#### b) Vorbereitung der Probe mit Perchlorsäure-Enteiuweissung

20 g (a) homogenisiertes Vollei in ein 100 ml-Becherglas genau einwiegen. 20 ml (b) Perchlorsäure-Lösung (hergestellt aus 40 Volumenanteilen Perchlorsäure (60%, w/v) und 60 Volumenanteilen bidest. Wasser) zugeben, ca. 5 min mit Ultra-Turrax homogenisieren und anschliessend filtrieren. 10 ml Filtrat (d) mit KOH, 30% (w/v) (zur Feineinstellung KOH, 1 M, verwenden) am pH-Meter auf pH 8,4 (7,8-8,6) einstellen. Die zur pH-Einstellung benötigten Volumina (e) messen. Lösung 15 min in Eisbad stellen und kalt filtrieren. Das auf 20-25°C gebrachte klare Filtrat zum Test einsetzen ( $v = 0,100$  ml bei angebrütetem Ei).

Zur Berechnung des Gehalts an D-3-Hydroxybuttersäure in Vollei nach der unter "Berechnung" angegebenen Formel wird die Einwaage der Probe in der Probelösung benötigt. Diese berechnet sich nach:

$$\text{Einwaage}_{\text{Probe}} = \frac{a \times 1000 \times d}{(b + a \times 0,75) \times (d + e)} \text{ [g/l]}$$

Hierbei sind:

a: Einwaage Vollei in g

1000: Umrechnungsfaktor g in mg

d: Volumen Filtrat in ml

b: Volumen Perchlorsäure in ml

0,75: Wasseranteil des Volleis in (%w/w)/100

e: Verbrauch an KOH in ml

(Die Dichte des Probe-eigenen Wassers bei 20-25°C ist praktisch gleich 1 g/ml und kann bei der Berechnung unberücksichtigt bleiben.)

#### Wiederfindungsversuch

Zur Absicherung der Messungen können Wiederfindungsversuche durchgeführt werden. Hierfür wird eine Lösung von D,L-3-Hydroxybutyrat, Mono-Natriumsalz hergestellt: 0,4 g/100 ml im Falle von angebrütetem Ei ( $v = 0,100$  ml), bzw. 0,4 g/l im Falle von Frischei ( $v = 1,000$  ml).

2,000 ml dieser Lösung werden dem homogenisierten Vollei bei der Vorbereitung der Probe mit Perchlorsäure-Enteiuweissung zugesetzt. Das zuzusetzende Perchlorsäure-Volumen ist entsprechend zu reduzieren (18 ml statt 20 ml) oder das geänderte Volumen ist bei der Berechnung zu berücksichtigen.

#### Störungen

Es kann gelegentlich nach der Perchlorsäure-Enteiuweissung vorkommen, dass kein Stillstand der Extinktion  $E_1$  beobachtet wird. In diesem Fall ist ein Probeerwert anzusetzen (Testansatz wie "Probe", jedoch ohne Suspension 4). Die Extinktionsdifferenz ( $E_2 - E_1$ )<sub>Probeerwert</sub> ist von  $\Delta E$  abziehen.

#### c) Extraktion der koagulierten Eimasse

Inhalt eines Eies 5 min homogenisieren. 2 g Homogenat auf 1 mg genau in einen 100 ml-Erlenmeyer-Kolben einwiegen, Kolben mit Uhrglas abdecken und zur Inaktivierung Ei-eigener Enzyme 45 min in ein Wasserbad von 85°C stellen. Kolben auf 20-25°C abkühlen und koagulierte Eimasse vom Kolbenboden lösen, 8 ml dest. Wasser hinzufügen und 10 min mit Magnetrührer kräftig rühren. Durch Faltenfilter filtrieren und leicht trübes Filtrat zum Test einsetzen (mit  $v = 0,100$  ml bei angebrütetem Ei und  $v = 1,000$  ml bei Frischei).

Erhöhtes Probevolumen ( $v = 1,000$  ml) bei der Berechnung berücksichtigen.

Die gemessene Extinktionsdifferenz ( $\Delta E$ ) sollte 0,400 nicht überschreiten, da sonst zu niedrige Werte erhalten werden.

Zur Berechnung des Gehalts an D-3-Hydroxybuttersäure in Ei (in g/1000 g) ist der Messwert (g/l Probelösung) mit dem Faktor  $F = 4,08$  zu multiplizieren. Dieser Faktor ergibt sich aus Wiederfindungsversuchen unter Berücksichtigung des zur Vorbereitung der Probe zugesetzten Wassers (8,0 ml) und des aus dem Eimaterial extrahierbaren freien Wasseranteils (0,16 ml) bezogen auf 2 g Ei;  $F = (8,0 + 0,16) : 2,0$ .

### Bestimmung von D-3-Hydroxybuttersäure in Eiprodukten

Flüssige Eimasse (homogenes Vollei, Vollei mit Kochsalz, Eigelb, Eiklar) auf 20-25°C bringen und mit Rührstab sorgfältig mischen. Vom Gemisch 2 g in einen 100 ml-Erlenmeyer-Kolben einwiegen und weiter wie oben bei "Vollei" angegeben verfahren.

### Bestimmung von D-3-Hydroxybuttersäure in Vollei-Pulver (Lit. 2.1)

Ca. 1 g Vollei-Pulver in einen 25 ml-Messkolben genau einwiegen, 12 ml bidest. Wasser und 1 Tropfen n-Octanol hinzufügen, mischen und 15 min im Wasserbad (ca. 100°C) erhitzen. Messkolben auf 20-25°C abkühlen, der Reihe nach zugeben und nach jeder Zugabe kräftig schwenken: 1 ml konzentrierte Carrez-I-Lösung (15,0 g Kaliumhexacyanoferrat(II),  $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$  ml), 1 ml konzentrierte Carrez-II-Lösung (30,0 g Zinksulfat,  $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$  ml). Mit NaOH (1 M) pH auf ca. 8-9 einstellen, mit bidest. Wasser Messkolben bis zur Marke auffüllen, mischen und mit Faltenfilter und Glasrichter filtrieren. 0,100-2,000 ml Filtrat zum Test einsetzen. Geändertes Probevolumen bei der Berechnung berücksichtigen.

### Bestimmung von D-3-Hydroxybuttersäure in proteinhaltigen Proben

15 g bzw. 15 ml homogene Probe mit 15 ml Perchlorsäure (1 M) 10 min im Homogenisator (oder Ultra-Turrax-Gerät) homogenisieren, zentrifugieren, Überstand dekantieren. Überstand durch Zugabe von festem  $KHCO_3$  neutralisieren (pH 7-8); ggf. zur Vermeidung von Schaumbildung 1 Tropfen n-Octanol zugeben. Zur quantitativen Fällung des gebildeten Kaliumperchlorats 20 min in Eisbad oder Kühlschranks stellen, anschliessend filtrieren. Filtrat auf 20-25°C bringen und zum Test einsetzen, ggf. gem. Verdünnungstabelle verdünnen.

Bei der Berechnung ist der Wassergehalt der Probe zu berücksichtigen.

## 12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch anwendbar in der Forschung bei der Analytik biologischer Proben. Zu Probenahme, Behandlung und Stabilität der Probe siehe Lit. 1.2-1.3.

## Literatur

- 1.1 Bergmeyer, H. U. & Bernt, E. (1965) Enzymatische Bestimmung von Keton-Körpern im Blut, *Enzymol. Biol. Clin.* **5**, 65-76
- 1.2 Williamson, D. H. & Mellanby, J. (1974) in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2. S. 1883-1886 und 1888, Verlag Chemie, Weinheim, und (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 4, pp. 1836-1839; Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
- 1.3 Kientsch-Engel, R. I. & Siess, E. A. (1985) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VIII, pp. 60-69, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- 2.1 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB, Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von L-Milchsäure, Bernsteinsäure und D-3-Hydroxybuttersäure in Ei und Eiprodukten, 05.00-2 (November 1987)
- 2.2 Council Directive of 20 June 1989 on hygiene and health problems affecting the production and the placing on the market of egg products (89/437/EEC), Official Journal No. L 212, 22/07/89 p. 0087
- 3.1 Parry, A. E. J., Robinson, D. S. & Wedzicka, B. L. (1980) An enzymic assay for  $\beta$ -hydroxybutyric acid in liquid whole egg, *J. Sci. Food Agric.* **31**, 905-910
- 3.2 Littmann, S., Schulte, E. & Acker, L. (1982) Beurteilung des hygienischen Zustands von Eiprodukten vor der Pasteurisierung bei dem Muster der organischen Säuren I. Gaschromatographische Methode zur gleichzeitigen Bestimmung der organischen Säuren des Hühnerreis, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **175**, 101-105; II. Das Säuremuster in Eiprodukten in Abhängigkeit von der hygienischen Situation, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **175**, 106-112
- 3.3 Littmann, S. (1985) Zur chemisch-analytischen Untersuchung von Eiprodukten und Beurteilung ihres hygienischen Zustandes an Hand des Gehaltes an verderbspezifischen organischen Säuren, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **81**, 345-350
- 3.4 Bergner-Lang, B., Beutler, H.-O. (1986) Enzymatische Bestimmung der D(-)-3-Hydroxybuttersäure in Eiprodukten, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **82**, 23-27
- 3.5 Littmann-Nienstedt, S. & Beutler, H.-O. (1988) Auswertung des Ringversuches der Arbeitsgruppe "Ei-Analytik" zur Bestimmung von (L-)Milchsäure, 3-Hydroxybuttersäure und Bernsteinsäure in Eiprodukten, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **84**, 320-322
- 3.6 Beutler, H.-O., Wurst, B., Schütz, A. & Henniger, G. (1986) A Fast Determination of D-3-Hydroxybutyrate for the Analysis of Eggs, poster presentation at Association of Official Analytical Chemists Annual International Meeting, Scottsdale, AZ, USA
- 3.7 Bergner-Lang, B. (1986) Enzymatische Bestimmung der D(-)-3-Hydroxybuttersäure in Eiprodukten, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **82**, 226-227
- 3.8 Hesselmann, R.P.X., Fleischmann, T., Hany, R. & Zehnder, A.J.B. (1999) Determination of polyhydroxyalkanoates in activated sludge by ion chromatographic and enzymatic methods, *J. Microb. Methods* **35**, 111-119

# D-3-Hydroxybuttersäure-Testkontroll-Lösung

Die Testkontroll-Lösung dient zur Kontrolle für die enzymatische Bestimmung von D-3-Hydroxybuttersäure in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien.

## Reagenzien

D,L-3-Hydroxybuttersäure, mono-Natrium-Salz, p.A.

## Herstellung der Testkontroll-Lösung

30 mg mono-Natrium-D,L-3-Hydroxybutyrat auf 0,1 mg genau einwiegen und im Messkolben mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen und gründlich mischen (entspricht ca. 0,12 g D-3-Hydroxybuttersäure/l).

Lösung vor Gebrauch frisch herstellen. Ggf. kann die Lösung portionsweise eingefroren werden.

## Anwendung:

1. *Zusatz der D,L-3-Hydroxybuttersäure-Testkontroll-Lösung zum Testansatz:*  
Die Testkontroll-Lösung wird anstelle der Probelösung zur Bestimmung eingesetzt. (Bei Berechnung der Hydroxybuttersäure-Konzentration der Testkontroll-Lösung ist zu berücksichtigen, dass bei der enzymatischen Bestimmung nur die D-Form gemessen wird.)  
(Die Messung der Testkontroll-Lösung ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen.)

### 2. "Quantitativer Nachstart":

Nach Ablauf der Reaktion mit Probelösung und Messung von  $E_3$  werden 0,050 ml der Testkontroll-Lösung zum Probeansatz gegeben. Nach Ablauf der Reaktion (ca. 30 min) wird die Extinktion  $E_4$  gemessen. Aus der Differenz ( $E_4 - E_3$ ) wird nach der allgemeinen Berechnungsformel die Konzentration berechnet. Hierbei ist das geänderte Gesamtvolumen zu berücksichtigen. Wegen der Verdünnung des Testansatzes durch die Zugabe der Testkontroll-Lösung weicht das Ergebnis geringfügig von dem Ergebnis ab, das gemäss Pkt. 1 ermittelt wurde.

### 3. Interner Standard:

Zur Prüfung auf richtige und störungsfreie Durchführung der Bestimmung (keine groben Fehler bei Testansatz; Probe ist frei von Hemmsubstanzen) kann die Testkontroll-Lösung als interner Standard verwendet werden:

| In Küvetten pipettieren | Leerwert | Probe    | Standard | Probe + Standard |
|-------------------------|----------|----------|----------|------------------|
| Lösung 1                | 0,600 ml | 0,600 ml | 0,600 ml | 0,600 ml         |
| Lösung 2                | 0,200 ml | 0,200 ml | 0,200 ml | 0,200 ml         |
| Lösung 3                | 0,200 ml | 0,200 ml | 0,200 ml | 0,200 ml         |
| bidest. Wasser          | 2,000 ml | 1,900 ml | 1,900 ml | 1,900 ml         |
| Probelösung             | -        | 0,100 ml | -        | 0,050 ml         |
| Testkontroll-Lsg.       | -        | -        | 0,100 ml | 0,050 ml         |

mischen, nach ca. 2 min Extinktionen der Lösungen messen ( $E_1$ ). Weiter verfahren wie im Arbeitsschema bei "Bestimmungsansatz" angegeben. Die entsprechenden Fussnoten und "Hinweise zur Testdurchführung" sind zu beachten.

Die Wiederfindung des Standards berechnet sich nach:

$$\text{Wiederfindung} = \frac{2 \times \Delta E_{\text{Probe + Standard}} - \Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}} \times 100 [\%]$$

### 4. Wiederfindungsversuch mit Originalproben:

Zur Absicherung der Messung einschliesslich Vorbereitung der Probe können Wiederfindungsversuche durchgeführt werden. Hierfür wird entweder die oben genannte Testkontroll-Lösung verwendet oder aber eine Testkontroll-Lösung mit einer geeigneten Konzentration.

Die Originalprobe wird mit und ohne Zusatz von D-3-Hydroxybuttersäure gemessen, wobei der Zusatz an D-3-Hydroxybuttersäure entsprechen soll

- der in der Originalprobe erwarteten D-3-Hydroxybuttersäure-Menge, oder
- der Menge, die z.B. gemäss Standards oder sonstiger Regelungen in der Originalprobe enthalten sein darf.



R-BIOPHARM AG  
An der neuen Bergstraße 17  
D-64297 Darmstadt  
Telefon + 49 61 51 / 81 02-0  
Fax + 49 61 51 / 81 02-20  
www.r-biopharm.com

