

Enzymatik in der Mikrotiterplatte

Zuckeranalytik zeitgemäß adaptiert

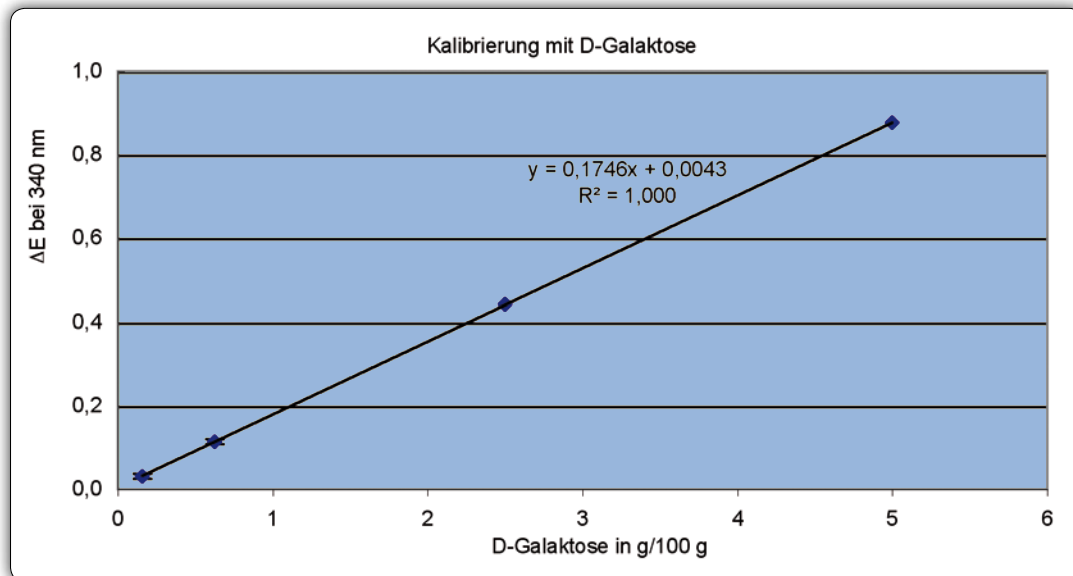


Abbildung 1: Kalibrierung mit D-Galaktose



Unser Autor: Tobias Hein,
Produktmanager ifp Institut für
Produktqualität GmbH

Enzymatische Methoden haben in der Routineanalytik von Zuckern, Fruchtsäuren und anderen Metaboliten einen festen Platz. Durch die außerordentliche Selektivität der verwendeten Enzyme sind die Verfahren hochspezifisch und gestatten eine sehr sensitive quantitative Bestimmung des Analyten. Enzymatische Tests liefern daher für eine Vielzahl verschiedener Lebensmittel Ergebnisse von hoher Genauigkeit.

Mit dem Launch der Produktlinie EnzymeFast® bietet die ifp Institut für Produktqualität GmbH erstmals eine Alternative zu den recht arbeitsaufwändigen herkömmlichen Enzymatik-Produkten.

Enzymatik als offizielle Methode

Die Enzymatik ist seit Jahrzehnten Bestandteil offizieller Methodensamm-

lungen. So stammen beispielsweise die in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB beschriebenen Verfahren zur Bestimmung des Laktose- bzw. Saccharosegehaltes in verschiedenen Lebensmitteln aus dem Jahr 1983 [1-4]. Entsprechende kommerzielle Kits für die Routineanalytik von Lebensmitteln basieren auf einem seit Jahrzehnten unveränderten Testprinzip, bei dem photometrische Einzelmessungen in Küvetten durchgeführt werden. Besonders bei hohen Probenzahlen ist diese Verfah-

rensweise sehr arbeitsaufwändig und mit hohem Materialverbrauch verbunden. Labors, die nach der amtlichen Methode arbeiten, hatten bisher jedoch kaum eine Alternative.

Warum nicht in der Mikrotiterplatte?

In Zeiten, in denen ELISA, PCR und Co. aus dem Labor nicht mehr wegzudenken sind, liegt diese Frage nahe. Effizientere Arbeitsabläufe, schnellere Ergebnisse, geringere Materialkosten, am besten gleich automatisierbar – die Anforderungen an die moderne Lebensmittelanalytik sind hoch.

Die neuartige Produktlinie EnzymeFast® greift diesen Trend auf. Erstmals ist ein kommerzielles Testkit, das dem amtlichen Verfahren nach § 64 LFGB entspricht, im zeitgemäßen Mikrotiterplat-

tenformat verfügbar. Die Vorteile liegen auf der Hand:

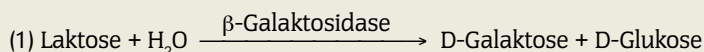
- Die vielen aufeinanderfolgenden Einzelmessungen in Küvetten entfallen.
- Parallele Messung von bis zu 90 Proben zzgl. Blindwert, Standards und Kontrolle ist möglich.
- Der Materialverbrauch wird minimiert.
- Der Arbeitsaufwand wird reduziert.
- Der Einsatz von Mehrkanalpipetten ist möglich.
- Tests im Plattenformat sind automatisierbar.

EnzymeFast® Laktose/ D-Galaktose – das Testprinzip

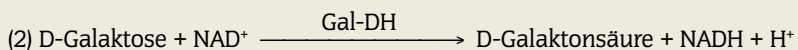
Das Testkit für die Bestimmung von Laktose und D-Galaktose enthält zwei Puffer, zwei Enzymlösungen (β -Galaktosidase und β -Galaktose-Dehydrogenase (Gal-DH), eine Kontrolllösung (5,0 g/100 ml Laktose-Monohydrat) sowie einen D-Galaktose-Standard. Darüber hinaus ist in jedem Kit eine UV-Mikrotiterplatte enthalten. Mit dem Test können 140 Bestimmungen (bspw. 120 Proben und vier Standardreihen mit jeweils vier Kalibrierpunkten plus Leerwert) durchgeführt werden.

Das Testprinzip ist einfach und lässt sich wie folgt zusammenfassen:

Laktose wird in Gegenwart des Enzyms β -Galaktosidase und Wasser bei pH 6,6 in D-Galaktose und D-Glukose gespalten (Gleichung 1).



Nach diesem Schritt wird erstmals die Absorption bei 340 nm im Mikrotiterplatten-Photometer gemessen (E1). Im Anschluss wird D-Galaktose durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) von β -Galaktose-Dehydrogenase (Gal-DH) bei pH 8,6 zu D-Galaktonsäure oxidiert (Gleichung 2).



Nun wird zum zweiten Mal bei 340 nm gemessen (E2). Das hierbei gebildete NADH wird über die Absorptionsdifferenz ($\Delta E = E2 - E1$) ermittelt und ist der D-Galaktose-Menge äquivalent. Kalibriert wird das Testsystem mit D-Galaktose. Die Umrechnung auf den Laktosegehalt der Probe erfolgt über den Faktor 1,9.

Laborinterne Vergleichspräzision: Laktosegehalte verschiedener Lebensmittelproben				
Probenmaterial	Küvettentest		EnzymeFast®	
	Mittelwert [g / 100 g (ml)]	V _k [%]	Mittelwert [g / 100 g (ml)]	V _k [%]
Referenzmaterial Milkschokolade (muva-S-0811)	8,87 ± 0,16 (n=12)	1,75	8,85 ± 0,33 (n=21)	3,78
Edelvollmilkschokolade	8,61 ± 0,10 (n=13)	1,18	8,64 ± 0,16 (n=15)	1,80
Fettarme H-Milch 1,5% Fett	4,56 ± 0,21 (n=7)	4,59	4,50 ± 0,13 (n=6)	2,97
Joghurt mild 3,5% Fett	2,82 ± 0,22 (n=5)	7,76	2,83 ± 0,10 (n=5)	3,44
Aprikosen-Orangen-Nektar; 50% Fruchtgehalt	<0,01 (n=4)		<0,012 (n=4)	
Tomatensaft	<0,01 (n=3)		<0,012 (n=3)	
Minizwieback Klassik	0,33 ± 0,032 (n=7)	9,59	0,33 ± 0,014 (n=8)	4,30
Butterkeks	1,06 ± 0,04 (n=6)	3,83	1,07 ± 0,04 (n=6)	3,68
Zwieback (ohne Zusatz von Ei- und Milchprodukten)	<0,01 (n=4)		<0,06 (n=4)	
Multivitamin Brausetabletten (laktosefrei)	<0,05 (n=3)		<0,06 (n=3)	

Tabelle 1

Der Arbeitsablauf

a) Probenvorbereitung

Die Probe wird homogenisiert und 1 g (ml) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen. Nach Zugabe von ca. 30 ml Wasser wird 15 min bei 60 °C extrahiert (währenddessen mehrmals gut schütteln). Im Anschluss wird mit Carrez-Reagenzien geklärt und der pH-Wert auf 7,5 bis 8,5 eingestellt. Die Lösung wird quantitativ in einen 100 ml Messkolben überführt, mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und durch einen Faltenfilter in einen Erlenmeyerkolben filtriert. Je nach erwartetem Laktosegehalt wird der so gewonnene Probenextrakt ggf. noch verdünnt.

b) Herstellung der Standardreihe

Der im Kit enthaltene D-Galaktose-Standard liegt in einer Konzentration von 10,0 g/100 ml vor. Für die Standardreihe wird er entsprechend ver- »

dar, bei denen der Gehalt des Analyten in der Probe üblicherweise über den Absorptionskoeffizienten ermittelt wird. Das Mitführen einer Standardreihe erlaubt die Quantifizierung unter realen Reaktionsbedingungen, wodurch sich der systematische Fehler minimieren lässt.

dünnt (5,000 g/100 ml; 2,500 g/100 ml; 0,625 g/100 ml; 0,156 g/100 ml).

c) Vorbereiten der Lösungen

Für die Bestimmung von D-Galaktose_{gesamt} (Laktose und freie D-Galaktose) werden Lösung 1 (Citratpuffer) und Lösung 2 (β -Galaktosidase) in einem Verhältnis von 4:1 vorgemischt. Soll in einem parallelen Ansatz nur die freie D-Galaktose bestimmt werden, wird Lösung 2 nicht benötigt.

d) Testansatz

20 μ l von Lösung 1+2 (Ansatz für freie D-Galaktose: nur Lösung 1) werden in die Kavitäten der Mikrotiterplatte vorgelegt und 20 μ l Probe, Standard, Kontrolle oder (für den Leerwert) Wasser hinzugegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden 270 μ l von Lösung 3 (Kaliumdiphosphatpuffer) hinzupipettiert. Nach einer 3-minütigen Inkubation erfolgt die erste Absorptionsmessung bei 340 nm.

Die in (2) dargestellte Reaktion wird jetzt durch Zugabe von 20 μ l Lösung 4 (Gal-DH) gestartet. Der Stillstand der Reaktion wird abgewartet (üblicherweise nach ca. 30 min) und die zweite Messung durchgeführt.

e) Auswertung

Die gemessenen Absorptionsdifferenzen ΔE werden in die ermittelte Kalibriergeradengleichung eingesetzt und so der D-Galaktosegehalt der Probe in g/100 g (ml) berechnet. Die Umrechnung in Laktose bzw. Laktose-Monohydrat erfolgt mit den Faktoren 1,9 bzw. 2,0.

Beispielhafte Validierungsdaten

a) Nachweisgrenze

Eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit wird erreicht durch eine Erhöhung der Probeneinwaage auf max. 5 g und eine Erhöhung des Probenvolumens im Testansatz auf max. 100 μ l. Die Nachweisgrenze unter diesen Bedingungen wurde ermittelt mit der sechsfachen Standardabweichung des Leerwertes. Die Nachweisgrenze wird extrapoliert aus der Standardkurve und beträgt 0,0026 g/100 g (ml) D - Galaktose (das entspricht 0,005 g/100 g [ml] Laktose). Sie liegt somit unterhalb des niedrigsten Standards.

b) Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze wird definiert als Konzentration des niedrigsten Standards (0,156 g/100 g [ml] D-Galaktose; entspricht 0,30 g/100 g [ml] Laktose). Wird die Probeneinwaage auf 5 g und das Probenvolumen auf 100 μ l (unverdünnt) erhöht, liegt die Bestimmungsgrenze bei 0,0062 g/100 g (ml) D-Galaktose, was einem Laktosegehalt von 0,012 g/100 g (ml) entspricht.

c) Vergleich mit der Küvettenmethode

Anhand verschiedener Lebensmittelmatrices wurden EnzymeFast[®] Laktose/D-Galaktose und ein kommerzieller Küvettest einander gegenübergestellt. Die Ergebnisse sind in jeder Hinsicht vergleichbar (s. Tabelle 1).

Fazit

Die Validierungsdaten für EnzymeFast[®] Laktose/D-Galaktose, aus denen hier nur ein Auszug gegeben wurde, zeigen, dass der Test nicht nur eine sehr niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenze aufweist, sondern auch ausgezeichnete Ergebnisse in Bezug auf Wiederfindung und Präzision liefert. Die Methode ist robust und für die routinemäßige Bestimmung des Laktose- bzw. D-Galaktosegehaltes in einer Vielzahl von Lebensmitteln geeignet. Darüber hinaus sind die mit EnzymeFast[®] erzielten Ergebnisse in jeder Hinsicht vergleichbar mit der herkömmlichen Küvettenmethode. Für den Einsatz des anwenderfreundlichen Mikrotiterplattenformats in der Laborroutine sprechen sowohl wirtschaftliche als auch praktische Argumente. Damit dürfte gesichert sein, dass die Enzymatik auch in Zukunft die Methode der Wahl für die Analytik von Zuckern und Säuren bleibt.

Neben EnzymeFast[®] Laktose/D-Galaktose ist auch ein Test für Saccharose/Glukose/Fruktose erhältlich. Weitere Parameter wie z. B. Ascorbinsäure, Milchsäure, Citronen- und Isocitronensäure sind in der Entwicklung.

Referenzen

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

[1] BVL L 07.00-23: Bestimmung von Laktose in Fleischerzeugnissen. 05-1983.

[2] BVL L 07.00-24: Bestimmung von Saccharose in Fleischerzeugnissen. 05-1983.

[3] BVL L 08.00-25: Bestimmung von Saccharose in Wurstwaren. 05-1983.

[4] BVL L 17.00-7: Bestimmung von Laktose in Brot einschließlich Kleingebäck aus Brotteigen. 11-1983.