

Vitaminbestimmung leicht gemacht

Analyse in Mikrotiterplatten

Dr. Wolfgang Weber

Die mikrobiologischen Analyseverfahren zur quantitativen Bestimmung der wasserlöslichen B-Vitamine sind vielseitig erprobt und bis heute unverzichtbar in der Vitaminanalytik. Die Verfahren zeichnen sich durch eine hohe Nachweisempfindlichkeit bei gleichzeitig hoher Spezifität aus.



Dr. Wolfgang Weber

»» Zur Person

Staatl. geprüft. Lebensmittelchemiker, Studium an der TU Berlin, Promotion 1994 an der TU Berlin auf dem Gebiet der Immunologie. Ist seit 1994 als Lebensmittelgutachter im Markt tätig und war vor seiner Selbstständigkeit Forschungsleiter in der Diagnostikindustrie. Er ist Gründer des ifp (Institut für Produktqualität).

Kontaktdaten siehe S. 51 **««**

Das ifp, Institut für Produktqualität, in Berlin hat daher ein mikrobiologisches Vitamin-Bestimmungsverfahren in Form eines gebrauchsfertigen Tests im Mikrotiterplattenformat entwickelt, deren Produktlinie unter dem Namen VitaFast® (Abb. 1) von der R-Biopharm AG, Darmstadt, vertrieben wird.

Das Prinzip

Bestimmte Mikroorganismen vermehren sich nur bei Anwesenheit des zu bestimmenden Vitamins. Diese Mikroorganismen müssen zunächst in einem optimalen Nährmedium gezüchtet werden. Bei Überimpfung in ein Nährmedium, dem nur das zu bestimmende Vitamin fehlt, unter-

bleibt das Wachstum. Bei Zusatz des Vitamins aus Standard oder Probe tritt dann im anfangs klaren Testmedium ein Wachstum ein. Die Keime vermehren sich in Abhängigkeit der Vitaminkonzentration und der eingesetzte Trübungsgrad wird fotometrisch vermessen.

Bei dem Testformat VitaFast® sind die Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit dem spezifischen Mikroorganismus beschichtet, der das zu bestimmende Vitamin verstoffwechselt. Die aufwändige Herstellung und Bevorratung von Keim und Keimsuspensionen entfallen. Die Menge der Mikroorganismen in den Kavitäten wurde an das jeweilige zu bestimmende Vitamin angepasst und optimiert. Zum Testansatz



Abb. 1 Folsäure-Test

muss lediglich das doppelt konzentrierte Assay-Medium sowie das Vitamin selbst in abgestuften Konzentrationen und der verdünnte Probenextrakt zugegeben werden. Waschschritte sind nicht notwendig. Der Ansatz wird lediglich im Brutschrank inkubiert und anschließend mittels ELISA-Reader direkt fotometrisch ausgelesen und ausgewertet.

Im Testkit enthalten sind neben dem Assay-Medium und sterilem Wasser auch ein definierter Vitaminstandard, der in einfachen Schritten für eine Standardkurve verdünnt wird. Die Grafik (Abb. 2) zeigt die dazugehörige Standardkurve.

Der Arbeitsablauf

Der Arbeitsablauf für die Bestimmung von Folsäure (natürlich und zugesetzt) wird im Einzelnen aufgezeigt.

Probenextraktion

1 g (ml) homogenisierte Probe und 20 mg Chicken-Pankreatin werden in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss eingewogen. Das Röhrchen wird mit 40 ml Phosphatpuffer (0,05 mol/l; 0,1 % Ascorbinsäure; pH 7,2) 2 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert und abschließend 30 min bei 95 °C erhitzt. 1 ml der Lösung wird in einer Biozentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verdünnt.

Der Einsatz des Chicken-Pankreatin ist notwendig, um die natürlichen Polyglutamate, die am Hauptring der Folsäure hängen, abzuspalten. Erst wenn diese abgespalten sind, kann der Mikroorganismus die Folsäure verdauen. Ein Vorgang der auch bei der Verdauung beim Menschen stattfindet.

Assaymedium

Der Trockenbeutel muss entfernt werden. 10 ml steriles Wasser aus dem Testkit in das Mediumfläschchen überführen und 5 min bei 95 °C erhitzen. Anschließend das Fläschchen auf unter 30 °C abkühlen. Den Inhalt in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss steril filtrieren (0,2 µm).

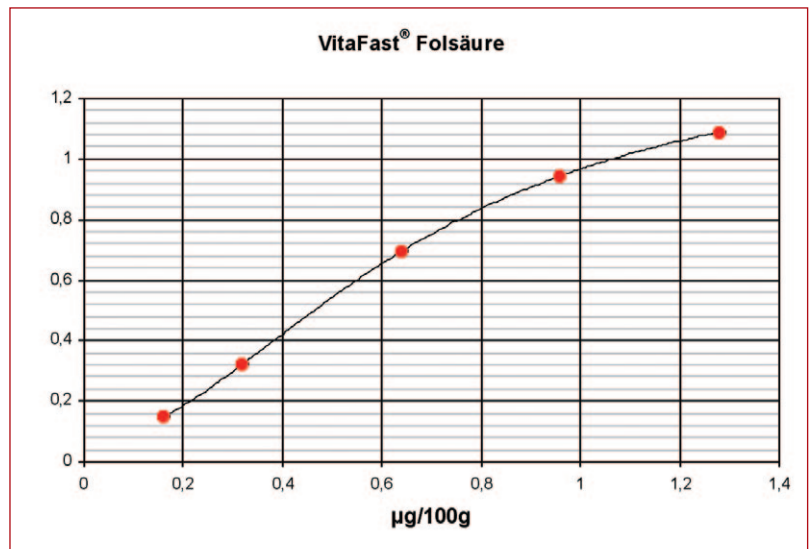


Abb. 2
VitaFast® Folsäure-
Standardkurve

Verdünnung des Probenextraktes

Nachdem die Verdünnung berechnet worden ist, wird der Überstand des Probenextraktes in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß verdünnt.

Standardkurve

Die Rekonstitution des Standards erfolgt mit x ml sterilem Wasser aus dem Testkit (x = siehe Standardflasche). Die Lösungen werden nach einem dem Testkit beigelegten Pipettierschema hergestellt.

Mikrotiterplatte

In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden je 150 µl Assaymedium und 150 µl Standard-/Probelösung pipettiert. Anschließend die Mikrotiterplatte mit Folie verschließen und im Dunkel 44–48 h bei 37 °C inkubieren.

Auswertung der Mikrotiterplatten

Die Mikrotiterplatte wird zuerst auf den Kopf gedreht, dann geschüttelt und zurückgedreht. Anschließend wird die Folie vorsichtig abgezogen. Die Auswertung erfolgt in einem ELISA-Reader bei 610–630 nm (alternativ bei 540–550 nm) mit Hilfe einer 4-Parameter-Software.

Ergebnisse

VitaFast® wurde in vielen Studien, offiziellen Ringversuchen und verschiedenen Matrices validiert. Das Testkit wurde so-

» Auswertung
in einem ELISA-
Reader «

Tab. 1 Messergebnisse vitaminisierte Bonbons

	Probe 1		Probe 2		Probe 3		Probe 4	
	VitaFast®	deklariert	VitaFast®	deklariert	VitaFast®	deklariert	VitaFast®	deklariert
Biotin ^a	390	225	–	–	347	225	349	230
Folsäure ^a	806	700	792	800	736	700	582	700
Vitamin B12 ^a	3,5	3,5	4,7	4,5	3,5	3,5	4,2	3,5
Niacin ^b	75	63	87	62,4	69,0	63	71	63
Pantothensäure ^b	13,8	21	25	29,7	13,5	21	14,5	21
Vitamin B1 ^b	4,9	4,9	7,8	5,8	5,8	4,9	4,6	4,9
Vitamin B2 ^b	7,5	5,6	8,0	7,1	7,0	5,6	6,4	5,6
Vitamin B6 ^b	8,6	7,0	6,0	6,3	8,8	7,0	7,7	7,0

^a in µg/100 g; ^b in mg/100 g**» Hohe Präzision und Genauigkeit «**

wohl an Handelsproben als auch an zertifizierten Referenzmaterialien eingesetzt. Vitaminisierte Bonbons und vitaminisierte Fruchtgummis wurden beispielsweise im Puffer oder Wasser gelöst, verdünnt und in den Test eingesetzt. Tabellen 1–3 zeigen einen Auszug der ermittelten Daten.

Der mikrobiologische Mikrotiterplattentest VitaFast® besteht in der Handhabung und Durchführung. Der Test zeichnet sich durch eine hohe Präzision und Genauigkeit aus. Die Präzisionsdaten (VK) liegen unter 5 %. Die Testformate sind mit zertifizierten Referenzmaterialien validiert. Die hohe Genauigkeit ist im Testformat begründet. Alle Arbeitsschritte und eingesetzten Testreagenzien (Standard, Assay-Medium, Keime und Inkubations-

zeit) sind optimal aufeinander abgestimmt. Je nach Probenaufarbeitung kann zwischen natürlichem und zugesetzten Vitamin differenziert werden. Bei Nährstoff angereicherten Proben reicht in der Regel eine wässrige Heißextraktion der Probe aus, natürliche Proben sollten hydrolytisch (enzymatisch) aufgeschlossen werden.

Das Mikrotiterplatten-Format erlaubt einen hohen Automatisierungsgrad, wobei die Investitionen für eine Automatisierung verhältnismäßig gering sind. Der Arbeitsaufwand reduziert sich im Vergleich zur klassischen mikrobiologischen Vitaminbestimmung um 60–70 %, der Materialeinsatz ist um den Faktor 30 geringer. Da im Testkit alle notwendigen Reagenzien enthalten sind (u. a. auch

Tab. 2 Messergebnisse für vitaminisierte Fruchtgummis

	Probe 1		Probe 2		Probe 3	
	VitaFast®	deklariert	VitaFast®	deklariert	VitaFast®	deklariert
Biotin ^a	–	–	220	150	98	70
Folsäure ^a	365	200	575	200	138	117
Vitamin B12 ^a	1,6	1,1	1,3	1,0	0,9	0,6
Niacin ^b	38,0	15,6	21,5	18,0	13,2	11,0
Pantothensäure ^b	14,4	7,4	10,0	6,0	4,1	3,5
Vitamin B1 ^b	–	–	–	–	0,7	0,6
Vitamin B2 ^b	–	–	–	–	0,4	0,7
Vitamin B6 ^b	3,0	1,5	2,2	2,0	1,9	1,4

^a in µg/100 g; ^b in mg/100 g

Tab. 3 Bestimmung von Vitamingehalten in Referenzmaterialien

Testmaterial		Folsäure ^a	Vitamin B12 ^a	Biotin ^a	Niacin ^b	Pantothensäure ^b	Vitamin B1 ^b	Vitamin B2 ^b	Vitamin B6 ^b
NIST 1846 Babynahrung	A	129 (101–157)	3,9 (3,6–4,2)	41,1 (34,5–47,7)	6,33 (5,6–7,1)	4,87 (4,1–5,6)	0,86 (0,7–1,0)	1,74 (1,6–1,8)	0,69 (0,6–0,8)
	B	133	4,0	40,3	6,27	4,63	0,82	1,74	0,68
AACCC VMA 399 Zerealien	A	1395 (1160–1620)	21,2 (12,2–25,0)		74,96 (66,7–82,2)	37,35 (31,0–41,9)	5,45 (4,8–6,5)	5,97 (4,9–7,6)	6,99 (6,0–8,3)
	B	1363	20,8		74,84	38,23	5,42	5,79	6,90
BCR CRM 121 Mehl	A	50 (43–57)					0,36 (0,33–0,4)		
	B	48,5					0,36		
BCR CRM 421 Milchpulver	A	142 (128–156)	3,4 (2,9–3,9)		6,8 (6,6–7,0)		0,51 (0,47–0,55)	1,45 (1,4–1,5)	0,55 (0,5–0,6)
	B	136	3,2		6,7		0,50	1,44	0,57
FAPAS T2130 Babynahrung	A		1,46 (0,82–2,11)						
	B		1,69						
FAPAS T2133 Flüssige Vitamine	A						6,60 (5,5–7,7)		7,71 (6,5–9,0)
	B						7,29		7,60
FAPAS T2139 Flüssigkonzentrat	A						8,12 (6,8–9,5)	8,86 (5,3–12,4)	9,02 (7,6–10,5)
	B						8,60	8,43	9,50
FAPAS Test 2141 Frühstückszerealien	A	458 (342–575)			21,3 (18,2–24,3)			2,07 (1,7–2,5)	2,07 (1,7–2,5)
	B	509			21,6			2,07	2,01
FAPAS T2143 Babynahrungs-Pulver	A		1,73 (0,97–2,50)						
	B		1,76						
FAPAS T2148 Frühstückszerealien	A							1,99 (1,6–2,4)	2,05 (1,7–2,5)
	B							2,17	2,08
FAPAS T2150 Babynahrungs-Pulver	A		1,60 (0,9–2,3)						
	B		1,58						

^a in µg/100 g; ^b in mg/100 g; A: Zielwert; B: VitaFast®

steriles Wasser), werden im Labor für die mikrobiologische Vitaminbestimmung keine Glasgeräte mehr benötigt, was eine einfache Handhabung mit gleichzeitig hoher Sicherheit in der Durchführung erlaubt.

Der Test wurde für alle wasserlöslichen Vitamine und Vitamin analog wirksame Substanzen entwickelt: Cyanocobalamin (B12), Folsäure, Biotin, Niacin, Pantothensäure, Thiamin (B1), Riboflavin (B2), Pyridoxin (B6) und Inositol. ■