

# Vitaminanalytik leicht gemacht – mit innovativen bioanalytischen Verfahren



– Bioanalytische Verfahren – Mikrobiologische Vitaminbestimmung – Qualitätssicherung – Vitaminanalytik –

**Lebensmittel werden heute in vielfältiger Form mit Vitaminen angereichert. Sowohl Hersteller als auch Untersuchungsämter und Handelslaboratorien sollten heute Verfahren zur Hand haben, um schnell und sicher die zugesetzten und natürlichen Vitamingehalte eines Lebensmittels überprüfen zu können.**

Im Markt etabliert und seit mehreren Jahrzehnten angewandt sind die mikrobiologischen Verfahren zur Bestimmung der wasserlöslichen Vitamine, die sich durch eine hohe Nachweisempfindlichkeit bei gleichzeitig hoher Spezifität auszeichnen. Die mikrobiologischen Bestimmungsverfahren werden ergänzt durch chromatographische Methoden wie HPLC oder LC/MS/MS. Zur Bestimmung der fettlöslichen Vitamine ist die HPLC mit UV-Detektion die Methode der Wahl.

Das Prinzip der mikrobiologischen Vitaminbestimmung wird nachfolgend beschrieben. 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 das zu bestimmende Vitamin fehlt, unterbleibt das Wachstum. Wird durch Zugabe des Standards oder der Probe das fehlende Vitamin zugesetzt, beginnen die Keime zu wachsen, was durch eine Trübung des Nährmediums sichtbar wird. Dies kann durch Messung des Trübungsgrades photometrisch bestimmt werden. Bei der traditionellen Methode muss der einzusetzende Mikroorganismus angezüchtet und durch regelmäßiges Überimpfen vor-

rätig gehalten werden. Vor der eigentlichen Bestimmung muss der Keim frisch hergestellt und die Keimzahl vor der Einsaat in das doppelt-konzentrierte Assay-Medium eingestellt wird. Dies erfordert einen hohen Personal- und Zeitaufwand. Die Genauigkeit und die Präzisionsdaten ergeben oftmals keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

Das ifp, Institut für Produktqualität in Berlin, hat ein mikrobiologisches Vitamin-Bestimmungsverfahren in Form eines gebrauchsfertigen Tests im Mikrotiterplattenformat entwickelt. Vertrieben wird die Produktlinie unter dem Namen VitaFast® von der R-Biopharm AG, Darmstadt.

Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte sind mit den spezifischen Mikroorganismen beschichtet, die das zu bestimmende Vitamin verstoffwechseln. Die aufwendige Herstellung und Bevorratung von Keimen und Keimsuspensionen entfällt. Die Menge der Mikroorganismen in den Kavitäten ist an das jeweils zu bestimmende Vitamin angepasst und optimiert. Zum Testansatz muss lediglich das Assay-Medium sowie das Vitamin selbst in abgestuften Konzentrationen und der Probenextrakt zugegeben werden. Waschschritte sind nicht notwendig. Der Ansatz wird im Brutschrank inkubiert und anschließend mittels Mikrotiterplattenphotometer gemessen und ausgewertet. Im Test enthalten sind neben dem Assay-Medium und sterilen Wasser ein charakterisierter Standard, der in einfachen Schritten für eine Standardreihe verdünnt werden muss.

## Ablaufschema für die Bestimmung von Vitamin B12 mittels VitaFast® Vitamin B12

### PROBENEXTRAKTION

- Einwaage von 1 g (ml) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen
- 20 ml deionisiertes Wasser zufügen, 250 µl NaCN-Lösung (1%ig, frisch angesetzt) zugeben und schütteln; pH 4,5 einstellen
- alternativ: anstatt deionisiertem Wasser kann ein Acetatpuffer, pH 4,5 zugegeben werden
- 300 mg Takadiastase zugeben, schütteln und 1 h bei 37 °C im Dunkeln inubieren; gelegentlich schütteln; auf 40 ml mit deionisiertem Wasser auf die Marke 40 ml auffüllen und 30 min bei 95 °C in einem Wasserbad erhitzen; danach schnell auf unter 30 °C abkühlen
- 1 ml der extrahierten Probe in ein 1,5 ml steriles Reaktionsgefäß überführen und 5 min zentrifugieren (> 8000 x g)



## ASSAY - MEDIUM

- Trockenbeutel mit einer Pinzette entfernen
- 10 ml steriles Wasser zugeben (im vom Test enthalten)
- 5 min bei 95 °C erhitzen, schnell auf unter 30 °C abkühlen
- steril filtrieren (0,2 µm) in ein 15 ml steriles Zentrifugenröhrchen



## PROBENVERDÜNNUNG

- Verdünnung des Probenextraktes berechnen
- Mikrotiterplatten-Manager ausfüllen
- klaren Überstand verdünnen



## STANDARDKURVE

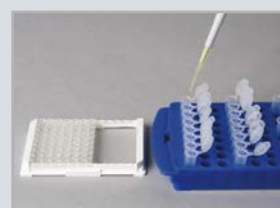
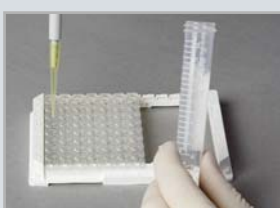
- Standard aus dem Test rekonstituieren



Standardkurve in µg/100 g (ml)	Steriles Wasser in µl		Standard Konzentrat in µl		Gesamt- volumen in µl
blank: 0	900	+	0	=	900
Standard 1: 0.03	900	+	100	=	1000
Standard 2: 0.06	400	+	100	=	500
Standard 3: 0.09	350	+	150	=	500
Standard 4: 0.12	300	+	200	=	500
Standard 5: 0.18	200	+	300	=	500

## MIKROTITERPLATTE

- benötigte Streifen in den beigefügten Rahmen überführen
- restliche Streifen in den Folienbeutel zurücklegen
- je 150 µl Assay-Medium pipettieren
- je 150 µl Standard/verdünnten Probenextrakt pipettieren
- Streifen mit Folie abkleben
- Inkubation 44 – 48 h bei 37 °C im Dunkeln



## MESSUNG UND AUSWERTUNG

- Folie erneut anpressen
- Mikrotiterplatten auf den Kopf drehen, schütteln und wieder zurückdrehen
- evtl. Luftblasen zerstören
- Messung im Mikrotiterplattenphotometer bei 610 – 630 nm, alternativ bei 540 – 550 nm



**Tab. 1: Bestimmung von Vitamingehalten in Referenzmaterialien**

Testmaterial		Folsäure µg/100g	Vitamin B12 µg/100g	Biotin µg/100g	Niacin mg/100g	Pantothensäure mg/100g	Vitamin B1 mg/100g	Vitamin B2 mg/100g	Vitamin B6 mg/100g
NIST 1846 Babynahrung	Zielwert	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)
	VitaFast®	133	4,0	40,3	6,27	4,63	0,82	1,74	0,68
AACC VMA 399 Zerealien	Zielwert	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)
	VitaFast®	1363	20,8		74,84	38,23	5,42	5,79	6,90
BCR CRM 121 Mehl	Zielwert	50 (43-57)					0,36 (0,33-0,4)		
	VitaFast®	48,5					0,36		
BCR CRM 421 Milchpulver	Zielwert	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)
	VitaFast®	136	3,2		6,7		0,50	1,44	0,57
FAPAS® T2130 Babynahrung	Zielwert		1,46 (0,82-2,11)						
	VitaFast®		1,69						
FAPAS® 2133 Flüssige Vitamine	Zielwert						6,60 (5,5-7,7)		7,71 (6,5-9,0)
	VitaFast®						7,29		7,60
FAPAS® 2139 Flüssigkonzentrat	Zielwert						8,12 (6,8-9,5)	8,86 (5,3-12,4)	9,02 (7,6-10,5)
	VitaFast®						8,60	8,43	9,50
FAPAS® Test 2141 Frühstückszerealien	Zielwert	458 (342-575)			21,3 (18,2-24,3)			2,07 (1,7-2,5)	2,07 (1,7-2,5)
	VitaFast®	509			21,6			2,07	2,01
FAPAS® 2143 Babynahrungspulver	Zielwert		1,73 (0,97-2,50)						
	VitaFast®		1,76						
FAPAS® 2148 Frühstückszerealien	Zielwert							1,99 (1,6-2,4)	2,05 (1,6-2,5)
	VitaFast®							2,17	2,08
FAPAS® 2150 Babynahrungspulver	Zielwert		1,60 (0,9-2,3)						
	VitaFast®		1,581,58						

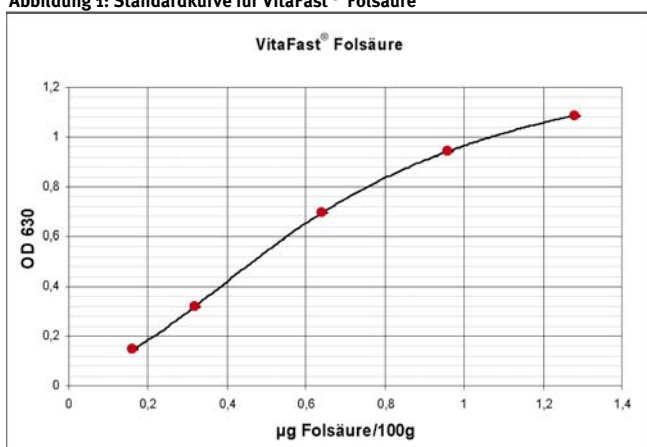
**Tab. 2: Variationskoeffizienten der VitaFast® Folsäure Standardkurven**

	Blank	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5
Absorbtion (n=6)	0,066	0,147	0,321	0,694	0,944	1,087
Variations- koeffizient (CV) in %	1,6	2,1	1,5	1,7	0,6	1,3

**Tab. 3: Inter Assay - Lot zu Lot Konformität des VitaFast® Folsäure Tests mit Referenzmaterial AACC VMA 399 (Zerealien) bestimmt**

Charge	AACC VMA 399 Zielkonzentration in µg/100 g	Analysiert µg Folsäure/100 g
QSKF 39479	1395 (1160 – 1620)	1299
QSKF 39423		1330
QSKF 39374		1322
QSKF 39335		1359
QSKF 39280		1374
QSKF 39129		1423
QSKF 39045		1275
QSKF 38835		1319
QSKF 38812		1468
QSKF 38791		1391
Mittelwert		1356
Standard- abweichung		59,3
Variations- koeffizient in %		4,4

Abbildung 1: Standardkurve für VitaFast® Folsäure



Zahlreiche Vergleichsstudien wurden mit den VitaFast® Tests durchgeführt und an Hand von Referenzmaterialien validiert. Daneben wurde an offiziellen Ringversuchen teilgenommen. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht einiger Daten daraus. In den Tabellen 2 und 3 sind weitere Validierungsparameter exemplarisch dargestellt.

In Abbildung 1 ist eine Standardkurve für VitaFast® Folsäure dargestellt.

Der mikrobiologische Mikrotiterplattentest besteht in der Handhabung und Durchführung. Waschschritte, die bei anderen immunologischen Verfahren notwendig sind, entfallen hier. Der Test zeichnet sich durch eine hohe Präzision und Genauigkeit aus. Der Variationskoeffizient (VK) liegt unter 10 %. Die Wiederfindungsraten nach Dotierung von realen Matrices betragen 95 – 105 %. Die hohe Genauigkeit ist im Testformat begründet. Alle Arbeitsschritte und eingesetzten Testreagenzien (Standard, Assay-Medium, Keime und Inkubationszeit) sind optimal aufeinander abgestimmt. Es können sowohl nährstoffangereicherte Matrices als auch natürliche Vitamingehalte erfasst werden. Die Probenaufarbeitung ist jeweils darauf zu adaptieren. Bei nährstoffangereicherten Proben reicht in der Regel eine wässrige Heißextraktion der Probe aus. Natürliche Proben sollten hydrolytisch (enzymatisch, Säure) aufgeschlossen werden.

Das Mikrotiterplatten-Format erlaubt einen hohen Automatisierungsgrad, wobei die Investitionen für eine Automatisierung verhältnismäßig gering sind. Der Zeitbedarf für die Testdurchführung reduziert sich im Vergleich zur klassischen mikrobiologischen Vitaminbestimmung um 60 – 70 %, der Materialeinsatz ist um den Faktor 30 geringer. Der Test wurde für alle wasserlöslichen Vitamine und analog wirksamen Substanzen entwickelt. Ausgewählte Aminosäuren (Lysin, Methionin und Cystin) stehen zusätzlich zur Verfügung.

Neben den ausführlich beschriebenen VitaFast® Vitamin Mikrotiterplatten-Tests bietet R-Biopharm Immunaффinitätssäulen (IAC) zur Probenaufarbeitung vor der HPLC-Analyse unter dem Namen EASI-EXTRACT® an. Neben der Vitamin B<sub>12</sub>- IAC konnte kürzlich die neue Folic Acid-IAC eingeführt werden. Herkömmliche HPLC-Verfahren zur Analyse von Folsäure in komplexen Lebensmitteln haben sich als schwierig erwiesen, da oft nur sehr niedrige Konzentrationen von Folsäure vorliegen. Daneben können vorhandene Pigmente und störende Substanzen in diesen Proben die Folsäure auf einem HPLC-Chromatogramm überdecken. Die EASI-EXTRACT® FOLIC ACID Immunaффinitätssäulen lösen diese Probleme durch die Verwendung eines hochspezifischen monoklonalen Antikörpers zur Isolierung und Konzentrierung der Folsäure aus der Probe, während gleichzeitig Pigmente und störende Komponenten aus der Säule ausgewaschen werden. Die Verwendung von EASI-EXTRACT® FOLIC ACID führt zu verbesserter Sensitivität und einer viel reineren Probe für die Analyse per HPLC. EASI-EXTRACT® FOLIC ACID Säulen wurden für den Nachweis von zugesetzter Folsäure in einer Reihe verschiedener Nahrungsmittel validiert. Mit Hilfe der Säulen kann Probenmaterial analysiert werden, das 10 – 100.000 µg Folsäure pro 100 g enthält. Vitamintabletten, Vitaminpremixe, Getreide, Mehl, Säuglingsnahrung (Pulver und Milch), diätetisches Milchpulver und Sojamilch wurden bereits erfolgreich analysiert. Außerdem wurden von NIST

(National Institute of Standards and Technology) bereitgestellte Referenzproben pulverförmiger Säuglingsnahrung sowie FAPAS® Getreideproben mit den EASI-EXTRACT® FOLIC ACID Säulen analysiert und die Ergebnisse lagen jeweils im angegebenen Bereich. Tabelle 4 zeigt verschiedenste Matrices getestet mit der EASI-EXTRACT® FOLIC ACID Immunaффinitätssäule.

Tab. 4: Bestimmung von Folsäuregehalten unterschiedlicher Matrices mit EASI-EXTRACT® FOLIC ACID

Probe	Deklarierte Gehalte	EASI-EXTRACT® FOLIC ACID Ergebnisse	Wiederfindung von EASI-EXTRACT® FOLIC ACID bezogen auf den deklarierten Gehalt
Premix	85500	86342,5	101%
Babynahrungs-Pulver	64,9	101,7	157%
Babynahrung	100	127	127%
FAPAS® Frühstückszerealien	438	458	104,5%
Diätetisches Milchpulver	60	58,9	98%
Cornflakes	166	229,7	138%
Zerealien 24	24	20	84%
Sojamilch	14	19,4	139%
NIST 1846 Babynahrung	101-157	108,5	84%

*Anmerkung: Lebensmittel werden generell mit Vitaminen überdotiert. Gehalte von über 100% der deklarierten Gehalte sind daher zu erwarten.*

Die Produktpalette zur Vitamin-Analytik wird durch die seit vielen Jahren eingeführten Enzymimmunoassays RIDASCREEN®FAST Vitamin B<sub>12</sub> und Folsäure und den RIDASCREEN® Biotin ergänzt.

R-Biopharm gewährleistet mit seinem breitgefächerten Angebot an verschiedensten Methoden individuelle Lösungen für die unterschiedlichen analytischen Fragestellungen seiner Kunden.

R-Biopharm AG  
Landwehrstrasse 54  
64293 Darmstadt  
www.r-biopharm.de

Institut für Produktqualität  
Teltowkanalstr. 2  
12247 Berlin  
www.produktqualitaet.com