

Vitaminanalytik leicht gemacht – mit bioanalytischen Verfahren

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 nachfol-

gend 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 Nähr-

mediums sichtbar wird. Dies kann durch Messung des Trübungsgrades photometrisch bestimmt werden.

■ Bei der traditionellen Methode muss der einzusetzende Mikroorganismus angezüchtet und durch regelmäßiges Überimpfen vorrätig gehalten werden. Vor der eigentlichen Bestimmung muss der Keim frisch hergestellt und die Keimzahl vor der Einsaat in das doppelt-konzentrierte Assay-Medium eingestellt

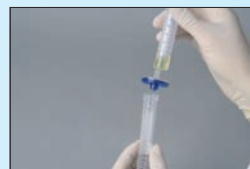
Probenextraktion

- 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: anstelle von 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; 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 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





Abb. 1: VitaFast® Folsäure Test

werden. 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-Bestimmungsver-

fahren in Form eines gebrauchsfertigen Tests im Mikrotiterplattenformat entwickelt. Vertrieben wird die Produktlinie unter dem Namen VitaFast® (Abb. 1) von der R-Biopharm AG, Darmstadt.

■ Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte sind mit den spezifischen Mi-

kroorganismen 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 jeweilige zu bestimmende Vitamin angepasst und optimiert. Zum Testansatz muss lediglich das doppelt-konzentrierte Assay-Medium sowie das Vitamin selbst in abgestuften Konzentrationen und der Probenextrakt zugegeben werden. Waschschriffe sind nicht notwendig. Der Ansatz wird im Brutschrank inkubiert und anschließend mittels ELISA-Reader photometrisch bestimmt und ausgewertet. Im Test enthalten ist neben dem Assay-Medium ein charakterisierter Standard, der in einfachen Schritten für eine Standardreihe verdünnt werden muss.

■ Unten auf dieser Seite ist der Ablauf in Form eines Ablaufschemas

für die Bestimmung von Vitamin B12 mittels VitaFast® Vitamin B12 dargestellt. Zahlreiche Vergleichsstudien wurden mit den VitaFast® Tests durchgeführt und an Hand von Referenzmaterialien validiert. Daneben wurde an offiziellen Ringversuchen teilgenommen. Tabelle 1 (nächste Seite) zeigt eine Übersicht einiger Daten daraus. In den Tabellen 2 und 3 sind weitere Validierungsparameter exemplarisch dargestellt. Abbildung 2 stellt eine Standardkurve für VitaFast® Folsäure dar.

■ Der mikrobiologische Mikrotiterplattentest VitaFast® besteht in der Handhabung und Durchführung. Waschschriffe, 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

Standardkurve

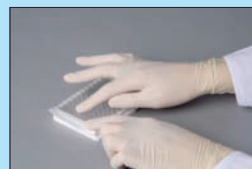
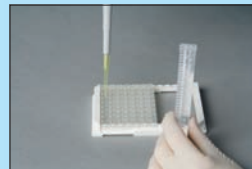
- Standard aus dem Test rekonstituieren

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



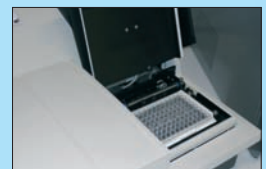
Mikrotiterplatte

- benötigte Streifen in den beigegeführten Rahmen überführen
- restliche Streifen in den Folienbeutel zurücklegen
- pipettiere je **150 µl** Assay-medium
- pipettiere je **150 µl** Standard / verdünnten Probenextrakt
- 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 ELISA-Reader bei 610 - 630 nm, alternativ bei 540 - 550 nm



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 nährstoff-angereicherten 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 wirksame Substanzen entwickelt. Ausgewählte Aminosäuren (Lysin, Methionin und Cystin) stehen zusätzlich zur Verfügung.

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 T2133 Flüssige Vitamine	Zielwert						6,60 (5,5-7,7)		7,71 (6,5-9,0)
	VitaFast®						7,29		7,60
FAPAS T2139 Flüssig- konzentrat	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 Früh- stückszere- alien	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 T2143 Babynahrungs- Pulver	Zielwert		1,73 (0,97-2,50)						
	VitaFast®		1,76						
FAPAS T2148 Frühstücks- zerealien	Zielwert							1,99 (1,6-2,4)	2,05 (1,6-2,5)
	VitaFast®							2,17	2,08
FAPAS T2150 Babynahrungs- Pulver	Zielwert		1,60 (0,9-2,3)						
	VitaFast®		1,58						

Tab. 1: Bestimmung von Vitamingehalten in Referenzmaterialien

■ Neben den ausführlich beschriebenen VitaFast® Vitamin Mikrotiterplatten-Tests bietet R-Biopharm Immunaffinitätsäulen (IAC) zur Probenaufarbeitung vor der HPLC-Analyse, unter dem Namen EASI-

	Blank	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5
Absorption (n=6)	0,066	0,147	0,321	0,694	0,944	1,087
Variationskoeffizient in %	1,6	2,1	1,5	1,7	0,6	1,3

Tab. 2: Variationskoeffizienten der VitaFast® Folsäure Standardkurven

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	
Standardabweichung	59,3	
Variationskoeffizient in %	4,4	

Tab. 3: Inter Assay – Lot zu Lot Konformität bestimmt mit Referenzmaterial AACC VMA 399 (Zerealien)

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	20	84 %
Sojamilch	14	19,4	139 %
NIST 1846 Babynahrung	101-157	108,5	84 %

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

Tab. 4: Bestimmung von Folsäuregehalten unterschiedlicher Matrices mit EASI-EXTRACT® Folic Acid

EXTRACT® an. Neben der Vitamin B12- 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

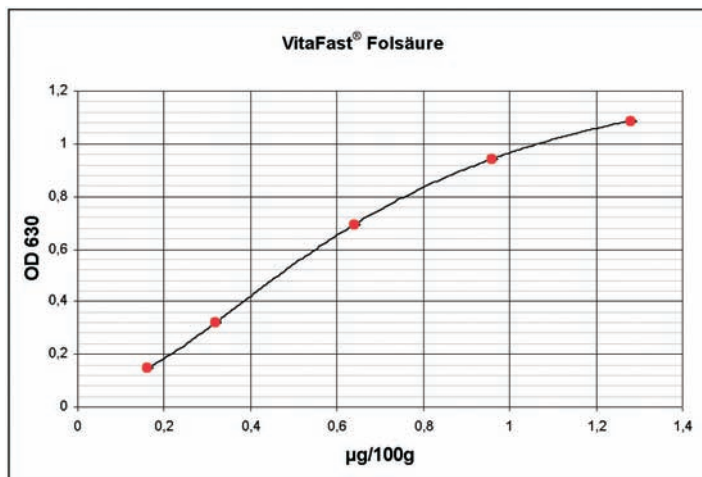


Abb. 2: Standardkurve für VitaFast® Folsäure

HPLC. EASI-EXTRACT® FOLIC ACID Säulen wurden für den Nachweis von zugesetzter Folsäure in einer Reihe verschiedener Nahrungsmittel validiert. Mithilfe der Säulen kann Probenmaterial analysiert werden, das 10 – 100.000 µg Folsäure pro 100 g enthält. Vitamin-tabletten, Vitaminpremixe, Getreide, Mehl, Säuglingsnahrung (Pul-

ver 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 Er-

gebnisse lagen jeweils im angegebenen Bereich. Tabelle 4 zeigt verschiedenste Matrices getestet mit der EASI-EXTRACT® FOLIC ACID Immunaффinitätssäule.

■ Die Produktpalette zur Vitamin-Analytik wird durch die seit vielen Jahren eingeführten Enzymimmunoassays RIDASCREEN®FAST Vitamin B12 und Folsäuren 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