

Lactose/D-Galactose

UV-Test

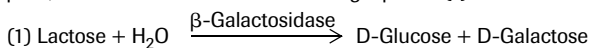
zur Bestimmung von Lactose und D-Galactose in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien

Best. Nr. 10 176 303 035

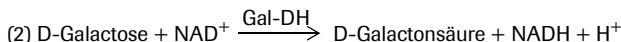
Test-Combination für 32 Bestimmungen

Prinzip (Lit. A1)

Lactose wird in Gegenwart des Enzyms β -Galactosidase und Wasser bei pH 6,6 in D-Glucose und D-Galactose gespalten (1).



D-Galactose wird durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) von β -Galactose-Dehydrogenase (Gal-DH) bei pH 8,6 zu D-Galactonsäure oxidiert (2).



Die während der Reaktion (2) gebildete NADH-Menge ist der Lactose- bzw. Galactose-Menge äquivalent. NADH ist Messgröße und aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm zu bestimmen.

Die Test-Combination enthält

1. Flasche 1 mit ca. 600 mg Lyophilisat, zusammengesetzt aus: Citrat-Puffer, pH ca. 6,6; NAD, ca. 35 mg; Magnesiumsulfat
2. Flasche 2 mit ca. 1,7 ml Suspension β -Galactosidase, ca. 100 U
3. Flasche 3 mit ca. 34 ml Lösung, zusammengesetzt aus: Kaliumdiphosphat-Puffer, pH ca. 8,6
4. Flasche 4 mit ca. 1,7 ml Suspension Gal-DH, ca. 40 U
5. Flasche 5 mit Lactose-Testkontroll-Lösung zur Testkontrolle (Die Messung der Testkontroll-Lösung ist nicht erforderlich zur Berechnung von Ergebnissen.) Testkontroll-Lösung unverdünnt verwenden. (Verwendbar bis: siehe Packungsetikett).

Herstellung der Lösungen

1. Inhalt der Flasche 1 mit 70 ml bidest. Wasser lösen.
2. Suspension der Flasche 2 unverdünnt verwenden.
3. Lösung der Flasche 3 unverdünnt verwenden.
4. Suspension der Flasche 4 unverdünnt verwenden.

Stabilität der Reagenzien

Der Inhalt der Flasche 1 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Lösung 1 ist bei 2-8°C 3 Monate haltbar.
Lösung 1 vor Gebrauch auf 20-25°C bringen.

Der Inhalt der Flaschen 2, 3 und 4 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

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

Bestimmungsansatz

Wellenlänge¹: 340 nm, Hg 365 nm oder Hg 334 nm

Glasküvette²: 1,00 cm Schichtdicke

Temperatur: 20-25°C

Testvolumen: 3,300 ml

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

Probelösung: 4-200 μg Lactose und D-Galactose/Testansatz³ (in 0,100-0,500 ml Probevolumen)

1 Das Absorptionsmaximum von NADH liegt bei 340 nm. Bei Verwendung von Spektralphotometern wird im Absorptionsmaximum, bei Verwendung von Spektral-Linienphotometern mit Hg-Dampflampe bei einer Messstrahlung von 365 nm oder 334 nm gemessen.

2 Anstelle von Glasküvetten sind ggf. auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.

3 S. Hinweise zur Testdurchführung

4 Auf die Ansätze Leerwert D-Galactose-Probe und D-Galactose-Probe kann verzichtet werden, wenn die Probe keine freie D-Galactose enthält.

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 (A2, B2)

In Küvetten pipettieren	Leerwert Lactose-Probe	Lactose-Probe	Leerwert ⁴ D-Galactose-Probe	D-Galactose-Probe ⁴
Lösung 1* Suspension 2 Probelösung**	0,200 ml 0,050 ml -	0,200 ml 0,050 ml 0,100 ml	0,200 ml - -	0,200 ml - 0,100 ml
mischen*, mindestens 20 min bei 20-25°C stehen lassen. Zugabe von				
Lösung 3 bidest.Wasser	1,000 ml 2,000 ml	1,000 ml 1,900 ml	1,000 ml 2,050 ml	1,000 ml 1,950 ml
mischen***, nach ca. 3 min Extinktionen der Lösungen messen (E_1). Reaktion starten durch Zugabe von				
Suspension 4	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
mischen***, Stillstand der Reaktion abwarten (ca. 15 min bei 50 μg Lactose/Test; ca. 30 min bei 200 μg Lactose/Test) und Extinktionen der Lösungen messen (E_2). Falls die Reaktion nach der angegebenen Zeit nicht zum Stillstand gekommen ist, Extinktionen weiter in 5 min-Abständen messen, bis eine konstante Extinktionsänderung pro 5 min erreicht ist.				

* Lösung 1, Suspension 2 und Probelösung jeweils auf den Boden der Küvette pipettieren, durch Schütteln mischen. Bei Verwendung eines Rührspatels diesen erst unmittelbar vor der Extinktionsmessung E_1 aus der Küvette nehmen.

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

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

Bei konstanter Extinktionszunahme von E_2 wird die Extinktion auf die Zeit der Zugabe von Suspension 4 (Gal-DH) extrapoliert.

Für Leerwerte und Proben Extinktionsdifferenzen ($E_2 - E_1$) berechnen. Extinktionsdifferenz der Leerwerte von Extinktionsdifferenzen der jeweiligen Proben abziehen:

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

Man erhält $\Delta E_{\text{D-Galactose}}$ (aus "D-Galactose-Probe") und

$\Delta E_{\text{Lactose + D-Galactose}}$ (aus "Lactose-Probe")

Die Differenz dieser Werte ergibt $\Delta E_{\text{Lactose}}$

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:

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

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

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

d = Schichtdicke [cm]

ε = Extinktionskoeffizient von NADH bei:
340 nm = 6.3 [$\text{l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]
Hg 365 nm = 3.4 [$\text{l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]
Hg 334 nm = 6.18 [$\text{l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

Hieraus ergibt sich für Lactose (als wasserfreie Lactose berechnet):

$$c = \frac{3,300 \times 342,3}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E_{\text{Lactose}} = \frac{11,30}{\varepsilon} \times \frac{\Delta E_{\text{Lactose}}}{\text{[g Lactose/l Probelösung]}}$$

für Lactose (als Monohydrat berechnet):

$$c = \frac{3,300 \times 360,32}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E_{\text{Lactose}} = \frac{11,89}{\epsilon} \times \Delta E_{\text{Lactose}} \left[\frac{\text{g Lactose-Monohydrat/l}}{\text{Probeflösung}} \right]$$

für D-Galactose:

$$c = \frac{3,300 \times 180,16}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E_{\text{Galactose}} = \frac{5,945}{\epsilon} \times \Delta E_{\text{Galactose}} \left[\frac{\text{g Galactose/l}}{\text{Probeflösung}} \right]$$

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

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

$$\text{Gehalt}_{\text{Lactose}} = \frac{c_{\text{Lactose}} \left[\frac{\text{g/l}}{\text{Probeflösung}} \right]}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ in g/l}} \times 100 \left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right]$$

$$\text{Gehalt}_{\text{D-Galactose}} = \frac{c_{\text{D-Galactose}} \left[\frac{\text{g/l}}{\text{Probeflösung}} \right]}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ in g/l}} \times 100 \left[\frac{\text{g}}{100 \text{ g}} \right]$$

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Menge an Lactose und D-Galactose zwischen 10 µg und 200 µg (Messung bei 365 nm) bzw. 4 µg und 100 µg (Messung bei 340, 334 nm) betragen. Zur Erzielung einer ausreichend hohen Extinktionsdifferenz ist die Probeflösung soweit zu verdünnen, dass die Konzentration an Lactose und D-Galactose zwischen 0,3 und 2 g/l bzw. 0,2 und 1 g/l liegt.

Verdünnungstabelle

Geschätzte Menge Lactose und D-Galactose im Liter Messung bei		Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor F
340 oder 334 nm	365 nm		
< 1,0 g	< 2,0 g	-	1
1,0-10,0 g	2,0-20,0 g	1 + 9	10
10,0-100 g	20,0-200 g	1 + 99	100
> 100 g	> 200 g	1 + 999	1000

Ist die gemessene Extinktionsdifferenz (ΔE) zu klein (z.B. < 0,100), so ist die Probeflösung erneut herzustellen (höhere Einwaage oder weniger starke Verdünnung), oder das in die Küvette zu pipettierende Probefvolumen (v) ist bis auf 0,500 ml zu erhöhen (Probe ggf. vorher neutralisieren). 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 Probefvolumen v ist in der Berechnungsformel entsprechend zu berücksichtigen.

2. Technische Hinweise

- In vielen Lebensmitteln ist keine freie D-Galactose vorhanden. Deshalb kann auf deren Bestimmung verzichtet werden.
- Falls lediglich D-Galactose (oder L-Arabinose, s. Pkt. 11) bestimmt werden soll, kann nach Zugabe der Probeflösung ohne Wartezeit weitergearbeitet werden.
- Die Berechnung der Ergebnisse erfolgt als wasserfreie Lactose (wird empfohlen) und als Lactose-monohydrat. Beim Vergleich von Ergebnissen ist immer darauf zu achten, dass mit der gleichen Molmasse gerechnet wurde. (Ergebnisse als Lactose-monohydrat sind 5% höher als die für Lactose).

3. Spezifität der Bestimmung

β-Galactosidase spaltet die β-galactosidische Bindung z.B. in Lactose und mit verringerter Geschwindigkeit in Lactulose unter Aufnahme von Wasser. Gal-DH oxidiert ausser D-Galactose auch L-Arabinose. In Lebensmitteln ist mit der Anwesenheit geringer Mengen freier D-Galactose und L-Arabinose nur dann zu rechnen, wenn sie durch chemische oder enzymatische Einwirkungen aus der natürlichen glykosidischen Bindung (z.B. von Quellstoffen) gelöst worden sind.

Bei der Analyse der Reinsubstanzen Lactose-monohydrat (Molmasse 360,32) und D-Galactose (Molmasse 180,16) sind Ergebnisse von unter 100 % zu erwarten, da diese Substanzen feuchtigkeitsempfindlich sind.

4. Empfindlichkeit und Nachweisgrenze

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Verfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten. Das entspricht bei einem maximal einzusetzenden Probefvolumen v = 0,500 ml und Messung bei 340 nm einer Lactose-Konzentration von 2 mg/l Probeflösung (bei v = 0,100 ml ent-

sprechend 10 mg/l Probeflösung) und einer D-Galactose-Konzentration von 1 mg/l Probeflösung (bei v = 0,100 ml entsprechend 5 mg/l Probeflösung).

Die Nachweisgrenze von 7 mg Lactose/l bzw. 4 mg D-Galactose/l ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz von 0,020 (gemessen bei 340 nm) und dem maximalen Probefvolumen v = 0,500 ml.

5. Linearität

Linearität der Bestimmung ist gegeben von ca. 4 µg Lactose + D-Galactose/Ansatz (7 mg Lactose + D-Galactose/l Probeflösung; Probefvolumen v = 0,500 ml) bis 200 µg Lactose + D-Galactose/Ansatz (2 g Lactose + D-Galactose/l Probeflösung; Probefvolumen v = 0,100 ml).

6. Präzision

Bei einer Doppelbestimmung von D-Galactose, ausgehend von einer Probeflösung, ist mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,005 bis 0,010 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probefvolumen v = 0,100 ml und Messung bei 340 nm einer Konzentration von 5-10 mg D-Galactose/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 0,05-0,1 g/100g.)

Bei einer Doppelbestimmung von Lactose (bei Anwesenheit von D-Galactose in der Probe) ist, ausgehend von einer Probeflösung, mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,010 bis 0,015 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probefvolumen v = 0,100 ml und Messung bei 340 nm einer Konzentration von 15-25 mg Lactose/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 0,15-0,25 g/100 g.)

In der Literatur sind folgende Daten für die Bestimmung von Lactose und D-Galactose veröffentlicht:

Lactose in Schokolade:

x = 6,01 g/100 g	s = 0,04 g/100 g	VK = 0,7 %	(Lit. A 1.1)
25 µg D-Galactose/Test	VK = 0,95 %		
85 µg Lactose/Test	VK = 1,13 %		
50 µg D-Galactose/Test	VK = 0,64 %		
170 µg Lactose/Test	VK = 0,78 %		(Lit. A 1.2)

Milch und Milchprodukte:

Lactose:	r = 0,05 × (Gehalt _{Lactose} in g/100 g)	g/100 g
	R = 0,06 × (Gehalt _{Lactose} in g/100 g)	g/100 g
D-Galactose:	r = 0,10 × (Gehalt _{D-Galactose} in g/100 g)	g/100 g
	R = 0,12 × (Gehalt _{D-Galactose} in g/100 g)	g/100 g

Lactose in Schokolade:	r = 0,188 g/100 g	s _(r) = ± 0,066	g/100 g
	R = 0,434 g/100 g	s _(R) = ± 0,153	g/100 g

Weitere Daten: s. Literatur (Lit. A 2.5)

7. Erkennen von Störungen

- Ist die Umsetzung von D-Galactose 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-Galactose (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.
Ein Nachstart der Reaktion mit Lactose ist nicht möglich, da nach Änderung der Reaktionsbedingungen von pH 6,6 auf pH 8,6 ("Umpufferung") Lactose nicht mehr gespalten wird.
- Große Fehler beim Testansatz und Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können auch erkannt werden, wenn aus einer Probeflösung eine Doppelbestimmung mit verschiedenen Probefvolumina (z.B. 0,100 ml und 0,200 ml) ausgeführt wird: Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probefvolumina proportional sein.

Die Verwendung von "einfachen" und "doppelten" Probefvolumina bei der Doppelbestimmung ist die einfachste Möglichkeit der Testkontrolle bei der Messung von Lactose.

Bei der Analytik fester Proben wird die Einwägung verschiedener Mengen (z.B. 1 g und 2 g) in 100 ml-Messkolben empfohlen. Bei gleichen Probefvolumina 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.

7.5 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.

8. Gefährlichkeit der Reagenzien

Die Reagenzien zur Bestimmung von Lactose und D-Galactose sind keine gefährliche 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.

9. Allgemeine Hinweise zur Vorbereitung der Proben

Flüssige, klare, farblose und annähernd neutrale Proben direkt, nach Verdünnen gemäss Verdünnungstabelle oder mit einem Probenvolumen bis 0,500 ml zum Test einsetzen;

trübe Lösungen filtrieren;

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

gefärbte Proben mit Polyamid oder Polyvinylpyrrolidon (PVPP, z. B. 1 g/100 ml Probe) behandeln;

feste und halbfeste Proben zerkleinern oder homogenisieren, mit heissem Wasser extrahieren bzw. lösen, wenn nötig filtrieren; ggf. Trübstoffe und Farbstoffe mit Carrez-Reagenzien (s.u.) entfernen;

Protein-haltige Proben mit Carrez-Reagenzien (s.u.) klären oder mit Perchlorsäure, bzw. Trichloressigsäure 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 und filtrieren; alternativ nach Extraktion mit heissem Wasser mit Carrez-Reagenzien klären;

Emulsionen mit Trichloressigsäure brechen oder mit Carrez-Reagenzien behandeln.

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 = 720 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.

10. Anwendungsbeispiele

Bestimmung von Lactose in Trinkmilch, Kondensmilch und Sauer- milch

Ca. 2 g Milch in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen. Mit ca. 20 ml bidest. Wasser verdünnen und zur Eiweissfällung 1,0 ml Trichloressigsäure (3 M) zugeben, 10 min stehenlassen und mit NaOH (1 M) neutralisieren. Den Kolben bis zur Marke mit Wasser auffüllen, filtrieren und die klare, evtl. leicht opaleszente Lösung zum Test einsetzen.

Bei Sauer Milch kann auf die Enteiweissung verzichtet werden.

Bei der Bestimmung von Lactose in Trinkmilch und Kondensmilch kann auch die Carrez-Klärung (s. Bestimmung von Lactose in Joghurt) angewendet werden. Einwaage: ca. 2 g.

Bestimmung von Lactose in Hartkäse oder Schokolade

Käsekrume reiben bzw. Schokolade raspeln, etwa 2 g in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, etwa 70 ml Wasser hinzufügen und 15 min bei ca. 70°C halten. Kolben häufig umschwenken. Nach Abkühlen auf 20-25°C mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen. Zur Fettabscheidung ca. 20 min in den Kühlschrank stellen, filtrieren. Die ersten ml verwerfen. Klare, auch leicht opaleszente Lösung zum Test einsetzen.

Bestimmung von Lactose in Schmelzkäse

Ca. 3 g einer homogenen Probe in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, etwa 70 ml bidest. Wasser hinzufügen und 15 min bei ca. 70°C unter ständigem Rühren (Magnetrührer) halten. Nach Abkühlen auf 20-25°C 2 ml Trichloressigsäure (3 M) hinzufügen und umschütteln. Mit ca. 6 ml Natronlauge (1 M) neutralisieren, Lösung auf 100 ml mit Wasser auffüllen.

Zur Fettabscheidung ca. 20 min in den Kühlschrank stellen, filtrieren oder zentrifugieren. Klare, auch leicht opaleszente, ggf. verdünnte Lösung zum Test einsetzen.

Alternativ kann auch das Verfahren "Bestimmung von Lactose in Joghurt" angewendet werden. Einwaage: ca. 3 g.

Bestimmung von Lactose in Kinder-Fertignahrung, Aufbaunahrung oder Speiseeis

Ca. 1 g Probe in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, etwa 60 ml Wasser hinzufügen und 15 min bei ca. 70°C halten. Kolben gelegentlich umschwenken. Nach Abkühlen auf 20-25°C 10 ml Perchlorsäure (3 M) hinzufügen, umschütteln. Nach 10 min mit Kalilauge (3 M) neutralisieren auf pH 7. Mit Wasser bis zur Marke auffüllen und zur Ausfällung des Kaliumperchlorat-Niederschlags 20 min in den Kühlschrank stellen, filtrieren. Klare, evtl. leicht trübe Lösung zum Test einsetzen, ggf. vorher verdünnen.

Bestimmung von Lactose in Joghurt, Creme-, Milch- und Molkenpulver

Ca. 1 g Probe in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, etwa 60 ml Wasser hinzufügen und 15 min bei ca. 70°C halten. Kolben gelegentlich umschwenken. Zur Klärung 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g Kaliumhexacyanoferrat(II), $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$ ml), 5 ml Carrez-II-Lösung (720g Zinksulfat, $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$ ml) und 10 ml NaOH (0,1 M) hinzufügen, nach jeder Zugabe mischen, auf 20-25°C bringen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen, filtrieren. Klare, evtl. leicht trübe Lösung zum Test einsetzen, ggf. vorher verdünnen.

Bestimmung von Lactose in Fleischwurst und Hackbraten

Ca. 5 g Probe, die zuvor im Mixer zerkleinert wurde, in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, etwa 70 ml Wasser hinzufügen und ca. 15 min bei 70°C halten. Auf 20-25°C abkühlen lassen und den Kolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Zur Fettabscheidung 20 min in den Kühlschrank stellen, filtrieren. Klare, evtl. leicht trübe Lösung zum Test einsetzen.

Bestimmung von Lactose in Protein-haltigen Proben

Protein-haltige Probelösungen mit Perchlorsäure (1 M) im Verhältnis 1:3 (1+2) versetzen, mischen, zentrifugieren, und einen aliquoten Teil der überstehenden Lösung mit KOH (2 M) neutralisieren, im Messkolben bis zur Marke auffüllen, zur Ausfällung des Kaliumperchlorat-Niederschlags 20 min in den Kühlschrank stellen, filtrieren. Klare, ggf. verdünnte Lösung zum Test einsetzen.

11. Bestimmung von L-Arabinose

Bei Abwesenheit von D-Galactose kann die Gal-DH-Reaktion zur Bestimmung von L-Arabinose angewendet werden. Die Reaktionszeit verlängert sich hierbei auf ca. 30 min (nach Zugabe von Suspension 4).

12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch anwendbar bei der Untersuchung von Pharmaka (Lit. A 4.1) und in der Forschung bei der Analytik biologischer Proben. Zu Probenahme, Behandlung und Stabilität der Probe s. Lit. A 1.1.

12.1 Bestimmung von Lactose in Rinder-Harn (Lit. A 4.2)

Harn gemäss Verdünnungstabelle verdünnen und zum Test einsetzen (Verdünnungsfaktor = F).

Hinweis: Nach Zugabe der Probelösung zu Lösung 1 und Suspension 2 mischen und **30 min** bei 20-25°C stehen lassen:

Berechnung

$$c = \frac{11,30 \times \Delta E \times F}{\epsilon} \quad [\text{g Lactose/l Probe}]$$

$$c = \frac{33,00 \times \Delta E \times F}{\epsilon} \quad [\text{mmol Lactose/l Probe}]$$

Messwellenlänge	Hg 365 nm	340 nm	Hg 334 nm
c [g/l]	$3,324 \times \Delta E \times F$	$1,794 \times \Delta E \times F$	$1,828 \times \Delta E \times F$
c [mM]	$9,706 \times \Delta E \times F$	$5,238 \times \Delta E \times F$	$5,340 \times \Delta E \times F$

12.2 Bestimmung von Lactose in Fermentationsproben und Zellkulturmedien

Analysenprobe, ggf. nach Zentrifugation, zum Abstoppen enzymatischer Vorgänge 15 min in Wasserbad (80°C) stellen und anschliessend zentrifugieren. Überstand, ggf. gemäss Verdünnungstabelle verdünnt, zur Bestimmung einsetzen. (Alternativ kann auch eine Enteiweissung mit Perchlorsäure oder mittels Carrez-Lösungen erfolgen. Siehe die oben beschriebenen Anwendungsbeispiele.)

Gallertartige Agar-Medien mit Wasser homogenisieren und wie oben beschrieben weiterbehandeln.

A. Literatur zur Bestimmung von Lactose und D-Galactose

- A 1.1 Kurz, G. & Wallenfels, K. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse, (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1225-1229 und S. 1324-1327, Verlag Chemie, Weinheim, und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1180-1184 and pp. 1279-1282, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc. New York and London
- A 1.2 Beutler, H. O. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 104-112, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- A 2.1 Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 61B (Enzymatische Bestimmungen)/1.4. (1981), Kapitel 1 (Milch)/1.11.2 (1995), Kapitel 2B (Sauermilchprodukte)/09 (1980), Kapitel 4 (Milchdauerwaren)/5.1 (1993), Kapitel 9 (Speiseeis)/4.3 (1983), Kapitel 22 (Diätetische Lebensmittel und Speziallebensmittel)/6.3 (1991), Kapitel 28A (Frucht- und Gemüsesäfte u.a.)/5.4 (1988), Kapitel 34 (Gärungsssig)/8.2 (1994)
- A 2.2 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) Deutsche Lebensmittel-Rundschau **77**, 3-4 (Galactose) und 10 (Lactose)
- A 2.3 Norme Belge - Belgische Norm NBN V 21-023 (1e éd., juin 1981) Lait et Produits Laitiers: Détermination Enzymatique du Lactose, Melk en Zuivelproducten, Enzymatische Bepaling van Lactose, Milch und Milchprodukte, Enzymatische Bestimmung von Lactose
- A 2.4 Deutsche Norm DIN 10344 (August 1982) Bestimmung des Lactose- und Galactosegehalts von Milch und Milchprodukten,
- A 2.5 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Lactose in Fleischerzeugnissen (07.00-23/ Mai 1983); Bestimmung von Lactose in Wurstwaren (08.00-24/Mai 1983); Bestimmung des Lactose- und Galactosegehalts von Milch und Milchprodukten (01.00-17/September 2010); Bestimmung des Lactose- und Galactosegehalts von Milchprodukten (02.00-9/September 2010); Bestimmung von Lactose in Brot einschliesslich Kleingebäck aus Brotteigen (17.00-7/November 1983); Bestimmung von Lactose in feinen Backwaren (18.00-8/November 1984); Bestimmung von Lactose in teiladaptierter Säuglingsnahrung auf Milchbasis (48.01-4/Mai 1985); Bestimmung von Lactose in Kinder-Zwieback und Zwiebackmehl (48.02.07-4/Mai 1985); Bestimmung von Lactose in Schokolade (44.00-6/Dezember 1985)
- A 2.6 Österreichisches Lebensmittelbuch (Codex Alimentarius Austriacus), Kapitel B15 (Kakao, Kakaoerzeugnisse, Lebensmittel mit Kakao oder Schokolade, Nougat, Nougatmassen) (1983); Kapitel B22 (Zucker und Zuckerarten) (1983)
- A 2.7 OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS of the Association of Official Analytical Chemists (Williams, S., ed.) 14th edition (1984), p. 284; 15th edition (1990), vol. 2, pp. 810-811 (984.15)
- A 2.8 Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, VDLUFA (Januar 1985) Methodenbuch Band VI, C 20.2.3 (VDLUFA-Verlag Darmstadt)
- A 2.9 Niederlande: Warenwet, Uitvoeringsvoorschriften (C II-6) Regeling Onderzoekingsmethoden voor brood; Methode 18: De Bepaling van het Lactosegehalte (Oktober 1986); Dit voorschrift betreft een methode voor de bepaling van het watervrije lactosegehalte in brood
- A 2.10 International Dairy Federation, International IDF Standard 79B:1991: Dried Milk, Dried Ice-Mixes & Processed Cheese, Determination of Lactose Content, Enzymatic Methods
- A 2.11 Standard der Russischen Föderation / Standard of the Russian Federation / GOSSTANDART ROSSII GOST R 51259-99 (1999) Milk and milk products. Method for determination of lactose and galactose content
- A 2.12 Draft International Standard ISO/DIS 5765-2 (1998) Dried milk, dried ice-mixes and processed cheese - determination of lactose content - Part 2: Enzymatic method utilizing the galactose moiety of the lactose
- A 2.13 Bulletin of the IDF 285 (1993) Chapter 13, pp. 95 - 105, Milk and milk products - Determination of lactose content - Enzymatic methods
- A 3.1 Essig, A. M. & Kleyn, D. H. (1983) Determination of lactose in milk: comparison of methods, J. Assoc. Off. Anal. Chem. **66**, 1514-1516

- A 3.2 Kleyn, D. H., & Trout, J. R. (1984) Enzymatic-ultraviolet method for measuring lactose in milk: collaborative study, J. Assoc. Off. Anal. Chem. **67**, 637-640
- A 3.3 Kleyn, D.H. (1985) Symposium: Role and Significance of Enzymes in Dairy Processing; Determination of Lactose by an Enzymatic Method, J. Dairy Sci **68**, 2791-2798
- A 3.4 Berner, G. (1970) Zuckerabbau während der Camembert-Reifung. Enzymatische Bestimmung von Lactose, D-Glucose und D-Galactose, Milchwissenschaft **25**, 275-280
- A 3.5 Steffen, Chr., Nick, B. & Blanc, B. (1975) Methodik zur enzymatischen Bestimmung von Lactose, Glucose, Galactose und Lactat in Käse. Schweiz. Milchw. Forsch. **4**, 13-15
- A 3.6 Salzer, U.-J. (1970) Lactose-Bestimmung in Fleischwaren, Die Fleischwirtschaft **50**, 1229-1232
- A 3.7 Bauer, F. & Stachelberger, H. (1984) Ein Schnellnachweis galaktosehaltiger Verdickungsmittel in Fleischwaren als Screening-Methode, Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. **8**, 129-132
- A 3.8 Mustranta, A. & Östman, C. (1997) Enzymatic Determination of Lactose and Galactose in Foods: NMKL Collaborative Methods Performance Study, JAOAC Intern. **80**, 584-590
- A 3.9 Saalfeld, U. & Freund, W. (1999) Charakterisierung pulverisierter Sauerteige und Möglichkeiten ihrer qualitativen Bestimmung im Brot - Teil II: Untersuchung der Acetat-, Lactose-, Hexanal-, Calcium-, Kalium- und Natriumgehalte und der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen, Deutsche Lebensmittel-Rundschau **95**, 297-304
- A 4.1 Henniger, G. & Hoch, H. (1981) Enzymatische Substrat-Bestimmungen in der pharmazeutischen Analytik, dargestellt an den Bestimmungen von L-Ascorbinsäure, Ethanol und Lactose, Deutsche Apotheker Zeitung **121**, 643-649
- A 4.2 Saidon Sissoko (1983) Der Lactose-Gehalt in Harn und Milch des Rindes bei subklinischer B-Streptokokken-Mastitis. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover

B. Literatur zur Bestimmung von Lactose und D-Glucose

- B 1.1 Bahl, R. K. (1971) An enzymatic method for the determination of skimmed milk powder in raw sausages, Analyst **96**, 88-92
- B 1.2 Bahl, R. K. (1972) An enzymatic method for the determination of lactose in milk including human milk, Analyst **97**, 559-561
- B 1.3 Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F. & Stork, H. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, 1241-1246; Verlag Chemie, Weinheim, und (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1196-1201; Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
- B 1.4 Kunst, A., Draeger, B. & Ziegenhorn, J. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) 3rd ed., vol. VI, pp. 163-172, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- B 2.1 International Dairy Federation, IDF, International Standard 79:1977, Milk and milk products - Determination of lactose in the presence of other reducing substances
- B 2.2 Milch und Milchprodukte - Bestimmung von Lactose in Gegenwart anderer reduzierender Substanzen, Internationaler Standard 79:1977, Milchwissenschaft **33**, 749-751 (1978)
- B 2.3 Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 61B (Enzymatische Bestimmungen)/1.5 (1981), Kapitel 1 (Milch)/11.2 (1987), Kapitel 2A (Milchmischgetränke)/09 (1980), Kapitel 9 (Speiseeis)/4.3 (1983)
- B 2.4 Nederlandse Norm NEN 3769 (Dezember 1981) Kaas: Fysische en chemische methoden van onderzoek: Enzymatische bepaling van het lactosegehalte, (Cheese - Physical and chemical test methods - Enzymatic determination of the lactose content)
- B 2.5 International Dairy Federation, International IDF Standard 79B:1991: Dried Milk, Dried Ice-Mixes & Processed Cheese, Determination of Lactose Content, Enzymatic Methods
- B 2.6 Draft International Standard ISO/DIS 5765-1 (1998) Dried milk, dried ice-mixes and processed cheese - determination of lactose content - Part 1: Enzymatic method utilizing the glucose moiety of the lactose
- B 2.7 Bulletin of the IDF 285, Chapter 13, pp. 95 - 105, Milk and milk products - Determination of lactose content - Enzymatic methods

Lactose-Testkontroll-Lösung (Flasche 5)

Konzentration: siehe Flaschenetikett*

Lactose-Testkontroll-Lösung ist eine stabilisierte wässrige Lösung von Lactose. Sie dient als Testkontroll-Lösung für die enzymatische Bestimmung von Lactose in Lebensmitteln und anderen Probematerialien.

Anwendung:

1. Zusatz der Lactose-Testkontroll-Lösung zum Testansatz:

Die Testkontroll-Lösung wird anstelle Probeflösung zur Bestimmung eingesetzt.

2. "Quantitativer Nachstart":

Ein "quantitativer Nachstart" mit Testkontroll-Lösung nach Ablauf der Reaktion kann nicht ausgeführt werden, da unter den Bedingungen des Testansatzes (Kaliumdiphosphat-Puffer, pH 8,6) Lactose nicht gespalten wird. Ggf. von 0,050 ml einer D-Galactose-Lösung (0,5 g/l) "nachstarten".

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:

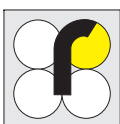
In Küvetten pipettieren	Leerwert Lactose-Probe	Lactose-Probe	Lactose-Standard	Lactose-Probe + Standard
Lösung 1	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml
Suspension 2	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
Probeflösung	-	0,100 ml	-	0,050 ml
Testkontroll-Lsg.	-	-	0,100 ml	0,050 ml

mischen. 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:

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

*Als wasserfreie Lactose angegeben



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

