

Lactose/D-Glucose

UV-Test

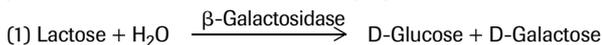
zur Bestimmung von Lactose und D-Glucose in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien

Best. Nr. 10 986 119 035

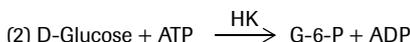
Test-Combination für je 32 Bestimmungen

Prinzip (Lit. A 1)

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



Bei pH 7,6 wird D-Glucose durch das Enzym Hexokinase (HK) und Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) unter gleichzeitiger Bildung von Adenosin-5'-diphosphat (ADP) phosphoryliert (2).



In Gegenwart des Enzyms Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) wird G-6-P von Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADP) zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert. Es entsteht reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADPH) (3).



Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der D-Glucose bzw. D-Galactose Menge äquivalent. NADPH ist Messgröße und wird aufgrund seiner Absorption bei 334, 340 oder 365 nm bestimmt.

Aus der Differenz der D-Glucose-Konzentration mit und ohne Hydrolyse durch β -Galactosidase wird der Gehalt an Lactose berechnet.

Die Test-Combination enthält

1. Flasche 1 mit ca. 600 mg Lyophilisat, zusammengesetzt aus:
Citrat-Puffer, pH ca. 6,6
2. Flasche 2 mit ca. 1,7 ml Suspension β -Galactosidase, ca. 100 U
3. Zwei Flaschen 3 mit je ca. 5 g Pulvergemisch, zusammengesetzt aus:
Triethanolaminpuffer, pH ca. 7,6; NADP, ca. 70 mg; ATP, ca. 170 mg; Magnesiumsulfat
4. Flasche 4 mit ca. 1,4 ml Suspension, zusammengesetzt aus:
Hexokinase, ca. 400 U; Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, ca. 200 U

Herstellung der Lösungen

1. Inhalt der Flasche 1 mit 70 ml bidest. Wasser lösen.
2. Suspension der Flasche 2 unverdünnt verwenden.
3. Inhalt einer Flasche 3 mit 32 ml bidest. Wasser lösen.
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 und 3 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Lösung 3 ist bei 2-8°C 4 Wochen, bei -15 bis -25°C 2 Monate haltbar.

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

Der Inhalt der Flasche 4 ist stabil bei 2-8°C (s. Packungsetikett).

Bestimmungsansatz

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

Glasküvette²: 1,00 cm Schichtdicke

Temperatur: 20-25°C

Testvolumen: 3,270 ml

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

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

1 Das Absorptionsmaximum von NADPH 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 auch handelsübliche Einwegküvetten geeignet.

3 S. Hinweise zur Testdurchführung

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 D-Glucose-Probe | D-Glucose-Probe |
|--|------------------------|---------------|--------------------------|-----------------|
| Lösung 1* | 0,200 ml | 0,200 ml | - | - |
| Suspension 2 | 0,050 ml | 0,050 ml | - | - |
| Probeflösung** | - | 0,100 ml | - | 0,100 ml |
| mischen*, mindestens 20 min bei 20-25°C stehenlassen. Zugabe von | | | | |
| Lösung 3 bidest. Wasser | 1.000 ml | 1.000 ml | 1.000 ml | 1.000 ml |
| mischen***, nach ca. 2 min Extinktionen der Lösungen messen (E ₁). Reaktion starten durch Zugabe von | | | | |
| Suspension 4 | 0,020 ml | 0,020 ml | 0,020 ml | 0,020 ml |
| mischen***, Stillstand der Reaktion abwarten (ca. 15 min) und Extinktionen der Lösungen messen (E ₂). Falls die Reaktion nach der angegebenen Zeit nicht zum Stillstand gekommen ist, Extinktionen weiter in 2 min-Abständen messen bis konstante Extinktionszunahme pro 2 min erreicht ist. | | | | |

* Lösung 1, Suspension 2 und Probeflösung jeweils auf den Boden der Küvette pipettieren, durch Schütteln mischen. Bei Verwendung eines Rührspatels diesen erst unmittelbar vor der Extinktionsmessung E₁ aus der Küvette nehmen.

** Vor der Dosierung der Probeflösung Enzymtest-Messpipette bzw. Pipettenspitze der Kolbenhubpipette mit der Probeflösung 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 E₂ wird die Extinktion auf die Zugabe von Suspension 4 (HK/G6P-DH) extrapoliert.

Für Leerwerte und Proben Extinktionsdifferenzen (E₂-E₁) berechnen. Extinktionsdifferenz des Leerwerts von Extinktionsdifferenz der zugehörigen Proben abziehen.

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

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

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

Die gemessenen Extinktionsdifferenzen sollten 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:

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

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

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

d = Schichtdicke [cm]

ϵ = Extinktionskoeffizient von NADPH bei:

$$340 \text{ nm} = 6,3 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Hg } 365 \text{ nm} = 3,5 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Hg } 334 \text{ nm} = 6,18 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

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

$$c = \frac{3,270 \times 342,3}{\epsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E_{\text{Lactose}} = \frac{11,19}{\epsilon} \times \Delta E_{\text{Lactose}} \text{ [g Lactose/l Probeflösung]}$$

für Lactose (als Monohydrat berechnet):

$$c = \frac{3,270 \times 360,32}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E_{\text{Lactose}} = \frac{11,78}{\varepsilon} \times \Delta E_{\text{Lactose}}$$

[g Lactose-Monohydrat/l Probelösung]

für D-Glucose:

$$c = \frac{3,270 \times 180,16}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta E_{\text{D-Glucose}} = \frac{5,891}{\varepsilon} \times \Delta E_{\text{D-Glucose}}$$

[g D-Glucose/l Probelösung]

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 Analyseergebnis auf die Einwaage bezogen:

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

$$\text{Gehalt}_{\text{D-Glucose}} = \frac{c_{\text{D-Glucose}} [\text{g/l Probelösung}]}{\text{Einwaage}_{\text{Probe}} \text{ in g/l Probelösung}} \times 100 [\text{g/100 g}]$$

1. Hinweise zur Testdurchführung

Im Testansatz muss die Menge an Lactose und D-Glucose 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 Probelösung soweit zu verdünnen, dass die Konzentration an Lactose und D-Glucose zwischen 0,3 und 2 g/l bzw. 0,2 und 1 g/l liegt.

Verdünnungstabelle

| Geschätzte Menge an Lactose und D-Glucose im Liter | | Verdünnung mit Wasser | Verdünnungsfaktor F |
|--|------------|-----------------------|---------------------|
| Messung bei | | | |
| 340 or 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 Probelösung erneut herzustellen (höhere Einwaage oder weniger starke Verdünnung), oder das in die Küvette zu pipettierende Probevolumen (v) ist bis zu 0,500 ml zu erhöhen. 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 Probevolumen v ist in der Berechnungsformel entsprechend zu berücksichtigen.

2. Technische Hinweise

- Lösung 1 und Enzymsuspension 2 werden z.B. mit einer Kolbenhubpipette auf den Boden der Küvette pipettiert. Anschließend wird die Probelösung auf die Oberfläche der Lösung in der Küvette (und nicht an die Küvettenwandung!) pipettiert. (Kontamination ist kein Problem, da für jede Probelösung eine eigene Pipette verwendet wird.)
- Ruckartiges Schwenken oder Schütteln der Küvette haben sich bewährt zum Mischen kleiner Volumina (z.B. 0,350 ml) in der Küvette.
- Die Berechnung der Ergebnisse erfolgt als wasserfreie Lactose (wird empfohlen) oder 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 für Lactose).

3. Spezifität der Bestimmung

Die Bestimmung ist spezifisch für Lactose und D-Glucose.

Bei der Analyse der Reinsubstanzen Lactose-monohydrat (Molmasse 360,32) und D-Glucose (wasserfrei; Molmasse 180,16), bzw. D-Glucose-monohydrat (Molmasse 198,17), 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 Probevolumen $v = 0,500$ ml und Messung bei 340 nm einer Lactose-Konzentration von 2 mg/l Probelösung (bei $v = 0,100$ ml entsprechend 10 mg/l Probelösung) und einer D-Glucose-Konzentration von

1 mg/l Probelösung (bei $v = 0,100$ ml entsprechend 5 mg/l Probelösung).

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

5. Linearität

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

6. Präzision

Bei einer Doppelbestimmung von D-Glucose, ausgehend von einer Probelösung, ist mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,005 bis 0,010 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probevolumen $v = 0,100$ ml und Messung bei 340 nm einer Konzentration von 5-10 mg D-Glucose/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-Glucose in der Probe) ist, ausgehend von einer Probelösung, mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,010 bis 0,015 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probevolumen $v = 0,100$ 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 über D-Glucose veröffentlicht:

Speiseeis-Mischung:

$$\begin{aligned} x = 12,814 \text{ g/100 g} & & r = 0,652 \text{ g/100 g} & & R = 0,905 \text{ g/100 g} \\ x = 13,371 \text{ g/100 g} & & r = 0,291 \text{ g/100 g} & & R = 1,112 \text{ g/100 g} \end{aligned}$$

Magermilchpulver:

$$\begin{aligned} x = 51,046 \text{ g/100 g} & & r = 1,150 \text{ g/100 g} & & R = 2,306 \text{ g/100 g} \\ x = 51,670 \text{ g/100 g} & & r = 1,082 \text{ g/100 g} & & R = 2,495 \text{ g/100 g} \end{aligned}$$

Weitere Daten: s. Literatur

(Lit. A2.7)

Bedingt durch die gleiche Arbeitstechnik (die Methoden unterscheiden sich nur durch Startenzyme und Coenzyme), kann davon ausgegangen werden, dass die statistischen Daten zur Messung von Lactose über D-Galactose auch zur Beurteilung der Messung von Lactose über D-Glucose herangezogen werden können:

Lactose in Schokolade:

$$x = 6,01 \text{ g/100 g} \quad s = 0,04 \text{ g/100 g} \quad \text{VK} = 0,7 \% \quad (\text{Lit. B1.1})$$

85 µg Lactose/Test

$$\text{VK} = 1,13 \%$$

170 µg Lactose/Test

$$\text{VK} = 0,78 \% \quad (\text{Lit. B1.2})$$

Lactose in Milch und Milchprodukten:

$$r = 0,05 \times (\text{Gehalt}_{\text{Lactose}} \text{ in g/100 g}) \quad \text{g/100 g}$$

$$R = 0,06 \times (\text{Gehalt}_{\text{Lactose}} \text{ in g/100 g}) \quad \text{g/100 g}$$

$$\text{Lactose in Schokolade: } r = 0,188 \text{ g/100 g} \quad s_{(f)} = \pm 0,066 \quad \text{g/100 g}$$

$$R = 0,434 \text{ g/100 g} \quad s_{(R)} = \pm 0,153 \quad \text{g/100 g}$$

Weitere Daten: s. Literatur

(Lit. B2.5)

7. Erkennen von Störungen

7.1 Ist die Umsetzung von D-Glucose nach der unter "Bestimmungsansatz" angegebenen Zeit beendet, so kann im allgemeinen auf einen störungsfreien Ablauf geschlossen werden.

7.2 Nach Ablauf der Reaktion kann durch Zugabe von D-Glucose (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 7,6 ("Umpufferung") Lactose nicht mehr gespalten wird.

7.3 Grobe Fehler beim Testansatz und Störungen der Bestimmung durch Inhaltsstoffe der Probe können auch erkannt werden, wenn aus einer Probelösung eine Doppelbestimmung mit verschiedenen Probevolumina (z.B. 0,100 ml und 0,200 ml) ausgeführt wird: Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein.

Die Verwendung von "einfachen" und "doppelten" Probevolumina 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 glei-

chen Probevolumina für die Testansätze muss Proportionalität zwischen Extinktionsdifferenz und Einwaage gegeben sein.

7.4 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-Glucose sind keine gefährlichen 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 Probevolumen 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;

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 Carrez-Reagenzien brechen.

Carrez-Klärung:

Geeignete Probemenge in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, ca. 60 ml bidest. Wasser hinzufügen. Flüssige Probe in einem 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 = 7,20 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.

Die Enteiweissung Protein-haltiger Proben mit Perchlorsäure oder Trichloressigsäure darf nur in Abwesenheit von Saccharose und Maltose in der Probe durchgeführt werden, da diese Disaccharide vollständig oder teilweise unter Freisetzung von D-Glucose hydrolysiert werden. Es wird die Carrez-Klärung empfohlen.

10. Anwendungsbeispiele

Bestimmung von Lactose in Milch, Magermilch, Buttermilch und Molke
Ca. 1 g Probe in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, etwa 60 ml Wasser hinzufügen. Zur Klärung 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g Kalium-hexacyanoferrat(II), $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$ ml), 5 ml Carrez-II-Lösung (7,20 g Zinksulfat, $ZnSO_4 \times 7 H_2O/100$ ml) und 10 ml NaOH (0,1 M) hinzufügen, nach jeder Zugabe mischen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen und filtrieren. Klare, evtl. leicht trübe Lösung zum Test einsetzen, ggf. vorher verdünnen.

Bestimmung von Lactose und D-Glucose in gezuckerter Kondensmilch und 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. Zur Klärung 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g Kalium-hexacyanoferrat(II), $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$ ml), 5 ml Carrez-II-Lösung (7,20 g 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, mischen und filtrieren. Klare, evtl. leicht opaleszente Lösung zum Test einsetzen, entsprechend Verdünnungstabelle vorher verdünnen.

Bestimmung von Lactose in Margarine und Butter

Ca. 5 g homogene Probe in ein Becherglas genau einwiegen, ca. 70ml bidest.

Wasser zugeben und auf beheizbarem Magnetrührer unter Rühren bis zum Schmelzen des Fettes erhitzen. In Eisbad abkühlen und wässrige Phase mit Pipette in 100 ml-Messkolben überführen. Extraktion mit ca. 20 ml bidest. Wasser wiederholen.

Messkolben auf 20-25°C bringen und mit bidest. Wasser bis zur Marke auffüllen. Messkolben 15 min in Eisbad oder Kühlschrank stellen. Durch Faltenfilter filtrieren. Filtrat, ggf. gemäss Verdünnungstabelle verdünnt, zur Bestimmung einsetzen.

Bestimmung von Lactose und D-Glucose 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 und D-Glucose in Kinder-Fertignahrung, Aufbaunahrung oder Speiseeis (s. Pkt. 9)

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) auf pH 7-8 einstellen. Mit Wasser bis zur Marke auffüllen, mischen 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 und D-Glucose in Fleischwurst und Hackbraten

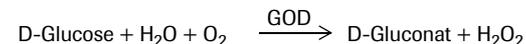
Ca. 5 g Probe, die zuvor im Mixer zerkleinert wurde, in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, etwa 70 ml Wasser hinzufügen und ca. 15 min bei 70°C halten. Auf 20-25°C abkühlen lassen und den Kolben mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Zur Fettabscheidung 20 min in den Kühlschrank stellen, filtrieren.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

Bestimmung von Lactose in Joghurt, Milch- und Molkenpulver

Ca. 1 g Probe in einen 100 ml-Messkolben genau einwiegen, etwa 60ml Wasser hinzufügen und 15 min bei ca. 70°C halten. Kolben gelegentlich umschwenken. Zur Klärung 5 ml Carrez-I-Lösung (3,60 g Kalium-hexacyanoferrat(II), $K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O/100$ ml), 5 ml Carrez-II-Lösung (7,20 g 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, mischen und filtrieren. Klare, evtl. leicht trübe Lösung gemäss Verdünnungstabelle verdünnen und zum Test einsetzen.

11. Besondere Vorbereitung der Probe zur Lactose-Bestimmung bei hohem D-Glucose-Überschuss

Ist das Verhältnis D-Glucose zu Lactose grösser als z.B. 10:1, so ist die Präzision der Lactose-Bestimmung beeinträchtigt. In diesem Fall sollte die Messung über die D-Galactose mit Test-Combination Lactose/D-Galactose, Best. Nr. 0 176 303, erfolgen. Alternativ muss die D-Glucose weitgehend entfernt werden: In Gegenwart von Glucose-Oxidase (GOD) und Luftsauerstoff wird D-Glucose zu D-Gluconat oxidiert:



Wasserstoffperoxid wird durch Katalase zerstört:



Reagenzien

Glucose-Oxidase (GOD) aus *Aspergillus niger*, 200 U/mg (25°C; D-Glucose als Substrat); Amylase und β -Fructosidase je < 0,01%

Katalase

Triethanolamin-hydrochlorid

$MgSO_4 \times 7 H_2O$

NaOH, 4 M

Herstellung der Lösungen für 10 Bestimmungen

Enzymlösung:

5 mg (Δ ca. 1000 U) GOD mit 0,750 ml bidest. Wasser lösen. 325 KU Katalase (aus Rinderleber; 25°C, H_2O_2 als Substrat) zugeben, mischen.

Pufferlösung:

5,6 Triethanolamin-hydrochlorid und 0,1 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$ mit 80 ml bidest. Wasser lösen, mit Natronlauge (4 M) auf pH 7,6 einstellen und mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllen.

Stabilität der Lösungen

Die Enzymlösung ist täglich frisch herzustellen.

Die Pufferlösung ist bei 2-8°C 4 Wochen haltbar.

Durchführung der D-Glucose-Oxidation

| | |
|---|----------|
| In 10 ml-Messkolben pipettieren | |
| Pufferlösung | 2,000 ml |
| Probelösung (mit ca. 0,5% D-Glucose) | 5,000 ml |
| Enzymlösung | 0,100 ml |
| 1 Stunde lang Luft (O ₂) durch die Mischung leiten, während der Oxidation pH-Wert mit Indikatorpapier überprüfen und ggf. mit NaOH die gebildete Säure neutralisieren. | |

Zur Inaktivierung der Enzyme GOD und Katalase Messkolben 15 min in siedendes Wasser stellen, abkühlen lassen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Mischen, ggf. filtrieren. Die klare Lösung zur Bestimmung einsetzen. Im Parallelansatz Rest-D-Glucose bestimmen und wie üblich bei der Berechnung berücksichtigen

12. Weitere Anwendungsmöglichkeiten

Die Methode ist auch anwendbar bei der Untersuchung von Pharmaka und z.B. in der Forschung bei der Analytik biologischer Proben.

Bestimmung von Lactose und D-Glucose 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.

Literatur

A. Literatur zur Bestimmung von Lactose und D-Glucose

- A 1.1 Bahl, R. K. (1971) An enzymatic method for the determination of skimmed milk powder in raw sausages, *Analyst* **96**,88-92
- A 1.2 Bahl, R. K. (1972) An enzymatic method for the determination of lactose in milk including human milk, *Analyst* **97**, 559-561
- A 1.3 Bergmeyer, H.U., Berni, 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
- A 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
- A 2.1 International Dairy Federation, IDF, International Standard 79:1977, Milk and milk products - Determination of lactose in the presence of other reducing substances
- A 2.2 Milch und Milchprodukte - Bestimmung von Lactose in Gegenwart anderer reduzierender Substanzen, Internationaler Standard 79:1977, *Milchwissenschaft* **33**, 749-751 (1978)
- A 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)
- A 2.4 Niederlandse 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)
- A 2.5 International Dairy Federation, International IDF Standard 79B:1991, Dried Milk, Dried Ice-Mixes & Processed Cheese, Determination of Lactose Content, *Enzymatic Methods*
- A 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
- A 2.7 Bulletin of the IDF 285 (1993) Chapter 13, pp. 95 - 105, Milk and milk products - Determination of lactose content - Enzymatic methods

Weitere Hinweise siehe Arbeitsanleitungen zu

Test-Combination Lactose/D-Galactose

Test-Combination D-Glucose

Test-Combination D-Glucose/D-Fructose

Test-Combination Saccharose/D-Glucose

Test-Combination Saccharose/

D-Glucose/D-Fructose

Best. Nr. 10 176 303 035

Best. Nr. 10 716 251 035

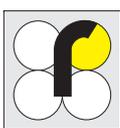
Best. Nr. 10 139 106 035

Best. Nr. 10 139 041 035

Best. Nr. 10 716 260 035

B. Literatur zur Bestimmung von Lactose und D-Galactose

- B 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
- B 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
- B 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 (Gärungssessig)/8.2 (1994)
- B 2.2 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **77**, 3-4 (Galactose) und 10 (Lactose)
- B 2.3 Norme Belge - Belgische Norm NBN V 21-023 (1e. d., juin 1981) Lait et Produits Laitiers: Determination Enzymatique du Lactose, Melk en Zuivelproducten, Enzymatische Bepaling van Lactose, Milch und Milchprodukte, Enzymatische Bestimmung von Lactose
- B 2.4 Deutsche Norm DIN 10344 (August 1982) Bestimmung des Lactose- und Galactosegehalts von Milch und Milchprodukten,
- B 2.5 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64. LFGB; Untersuchung von Lebensmitteln: Bestimmung von Lactose in Fleischerzeugnissen (0700-23/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 teildaptierter 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)
- B 2.6 Österreichisches Lebensmittelbuch (Codex Alimentarius Austriacus), Kapitel B15 (Kakao, Kakaoerzeugnisse, Lebensmittel mit Kakao oder Schokolade, Nougat, Nougatmassen) (1983); Kapitel B22 (Zucker und Zuckerkarten) (1983)
- B 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)
- B 2.8 Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten, VDLUFA (Januar 1985) *Methodenbuch Band VI, C 20.2.3* (VDLUFA-Verlag Darmstadt)
- B 2.9 Niederlande: Warenwet, Uitvoeringsvoorschriften (C II-6) Regeling Onderzoeksmethoden 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
- B 2.10 International Dairy Federation, International IDF Standard 79B:1991: Dried Milk, Dried Ice-Mixes & Processed Cheese, Determination of Lactose Content, *Enzymatic Methods*
- B 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
- B 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
- B 2.13 Bulletin of the IDF 285 (1993) Chapter 13, pp. 95 - 105, Milk and milk products - Determination of lactose content - Enzymatic methods
- B 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
- B 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
- B 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
- B 3.4 Berner, G. (1970) Zuckerabbau während der Camembert-Reifung, *Enzymatische Bestimmung von Lactose, D-Glucose und D-Galactose*, *Milchwissenschaft* **25**, 275-280
- B 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
- B 3.6 Salzer, U.-J. (1970) Lactose-Bestimmung in Fleischwaren, *Die Fleischwirtschaft* **50**, 1229-1232
- B 3.7 Bauer, F. & Stachelberger, H. (1984) Ein Schnellnachweis galaktosehaltiger Verdickungsmittel in Fleischwaren als Screening-Methode, *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **8**, 129-132
- B 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
- B 3.9 Saalfeld, U. & Freund, W. (1999) Charakterisierung pulverisierter Sauerteige und Möglichkeiten ihrer qualitativen Bestimmung im Brot - Teil II: Untersuchung von Acetat-, Lactose-, Hexanal-, Calcium-, Kalium- und Natriumgehalte und der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **95**, 297-304
- B 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
- B 4.2 Saidon Sissoko (1983) Der Lactose-Gehalt in Harn und Milch des Rindes bei subklinischer B-Streptokokken-Mastitis. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover



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

