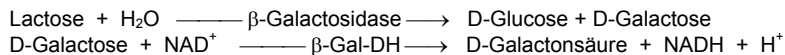


UV Methode für je ca. 16 Ansätze / bzw. ca. 32 Ansätze Lactose

 Nur für den Laborgebrauch
Lagern bei +2 bis +8°C

Die Methode Lactose/D-Galactose ist enthalten im deutschen, niederländischen, österreichischen und schweizerischen Lebensmittelrecht. Empfohlen z. B. von AOAC, IDF, VDLUFA. Standardisiert von DIN, GOST, ISO (Entwurf), NBV.

Prinzip



Ref.: 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

Durchführung der Bestimmung

Wellenlänge: 340 nm (NADH)
 $\epsilon = 6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
 Schichtdicke: 1,00 cm (Glas oder Plastikkuvette)
 Temperatur: +20 bis +25°C
 Testvolumen: 3,300 ml
 Messung: gegen Luft oder Wasser
 Probelösung: 4 bis 200 µg Lactose + D-Galactose in 0,100 bis 0,500 ml Probelösung.

Reagenzien

- # 1: Lyophilisat mit Citrat-Puffer, pH ca. 6,6, ca. 35 mg NAD (Stabilität siehe Packungsetikett). *Inhalt der Flasche # 1 mit 7 ml bidest. Wasser lösen.* Die Lösung ist 3 Monate bei +2 bis +8°C stabil.
- # 2: Ca. 1,7 ml Suspension β -Galactosidase (ca. 100 U) in Ammoniumsulfat (Stabilität siehe Packungsetikett). *Die Suspension ist gebrauchsfertig.* Flasche vorsichtig schwenken bevor die Suspension pipettiert wird.
- # 3: Ca. 34 ml Kalium-diphosphat-Puffer, pH ca. 8,6 (Stabilität siehe Packungsetikett). *Die Lösung ist gebrauchsfertig.*
- # 4: Ca. 1,7 ml Suspension β -Galactose-Dehydrogenase (ca. 40 U) in Ammoniumsulfat (Stabilität siehe Packungsetikett). *Die Suspension ist gebrauchsfertig.* Flasche vorsichtig schwenken bevor die Suspension pipettiert wird.

Zusätzlich werden benötigt (nicht im Kit enthalten):

Standard-Lösung Lactose-monohydrat, ultrapur, 1 g/l zur Testkontrolle;
 Standard-Lösung D-Galactose, ultrapur, 0,5 g/l zur Testkontrolle.

Die Reagenzien zur Bestimmung von Lactose und D-Galactose sind nicht gefährlich. Die allgemeinen Regeln beim Arbeiten in chemischen Laboratorien sollten jedoch eingehalten werden. Nach Gebrauch können die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgt werden. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

Vorbereitung der Proben

1. Klare, farblose, annähernd neutrale flüssige Proben ggf. verdünnen, um eine Probelösung mit 0,1 bis 1 g Lactose + D-Galactose pro Liter zu erhalten.
2. Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren, ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
3. Kohlensäurehaltige Proben, z. B. durch Filtration entgasen, oder NaHCO_3 zugeben, bis die Lösung schwach alkalisch ist. Ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
4. Feste Proben zerkleinern (Korngröße < 0,3 mm), bzw. halb-feste (pastöse) Proben homogenisieren, mit Wasser extrahieren, oder in Wasser lösen, filtrieren und ggf. verdünnen (s. Pkt. 1).
5. Fetthaltige Proben mit heißem Wasser (Temperatur über dem Schmelzpunkt des Fettes), z. B. in einem 100 ml-Messkolben extrahieren. Auf +20°C bringen, Messkolben bis zur Marke füllen. 15 min in Eis, bzw. 30 min in Kühlschrank stellen, filtrieren. Alternativ mit Carrez Reagenzien klären (wird empfohlen).
6. Proteinhaltige Proben mit Carrez-Reagenzien klären.
7. Proteinhaltige Proben mit Perchlorsäure deproteinieren.

Bestimmungsansatz für Lactose / D-Galactose (je ca. 16 Ansätze)

In Küvetten pipettieren:	Leerwert Lactose Probe	Ansatz Lactose Standard ¹	Ansatz Lactose Probe ^{2,3}	Leerwert D-Galactose Probe	Ansatz D-Galactose Probe	Ansatz mit internem Standard ⁴
Citrat-Puffer, NAD-Lösung # 1	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml
β -Galactosidase-Suspension # 2	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	-	-	0,050 ml
Probelösung⁶ (z.B. 0,1 bis 1 g Lactose/l)	-	-	0,100 ml	-	0,100 ml	0,100 ml
Standardlösung ⁶ (z.B. 1 g Lactose/l)	-	0,100 ml	-	-	-	0,100 ml
Mischen, z. B. durch vorsichtiges Schütteln der Küvette. Mindestens 30 min bei +20 bis +25°C inkubieren. Zugeben:						
Kalium-diphosphat-Puffer, Lösung # 3	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	2,050 ml	1,950 ml	1,800 ml
Mischen⁷, nach ca. 3 min Extinktionen (E₁) messen. Zugeben:						
β -Gal-DH-Suspension # 4	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
Mischen⁷, nach ca. 30 min Extinktionen (E₂) messen. Extinktionsmessungen nach weiteren 5 min wiederholen⁸.						

Siehe Hinweise auf der nächsten Seite.

Bestimmungsansatz für Lactose via D-Galactose⁹ (ca. 32 Ansätze)

Wenn die Probe keine freie D-Galactose enthält, wird auf die Bestimmung von D-Galactose verzichtet.

In Küvetten pipettieren:	LeerwertLactose ⁹ Probe	Ansatz Lactose Standard ^{1,9}	Ansatz Lactose Probe ^{2,9}	Ansatz Duplikat Probe ^{3,9}	Ansatz mit internem Standard ^{4,9}	Ansatz für Spurenanalytik ^{5,9}
Citrat-Puffer, NAD-Lösung # 1	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml
β-Galactosidase-Suspension # 2	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
Probelösung⁶ (z.B. 0,1 bis 1 g Lactose/l)	-	-	0,100 ml	0,200 ml	0,100 ml	0,500 ml
Standardlösung ⁶ (z.B. 1 g Lactose/l)	-	0,100 ml	-	-	0,100 ml	-
Mischen, z.B. durch vorsichtiges Schütteln der Küvette. Mindestens 30 min bei +20 bis +25 °C inkubieren. Zugeben:						
Kalium-diphosphat-Puffer, Lösung # 3	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Bidest. Wasser	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	1,800 ml	1,800 ml	1,500 ml
Mischen⁷, nach ca. 3 min Extinktionen (E₁) messen. Zugeben:						
β-Gal-DH-Suspension # 4	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
Mischen⁷, nach ca. 30 min Extinktionen (E₂) messen. Extinktionsmessungen nach weiteren 5 min wiederholen⁸.						

Berechnung

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

$$c = (V \times MW \times \Delta E) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \text{ [g D-Galactose bzw. Lactose/l Probelösung]}$$

Lactose / D-Galactose Ansatz

Um den richtigen Lactose-Wert zu ermitteln, muss das Ergebnis des D-Galactose Tests abgezogen werden:

$$\Delta E_{\text{Lactose}} = [(E_2 - E_1)_{\text{Ansatz Lactose}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert Lactose}}] - [(E_2 - E_1)_{\text{Ansatz D-Galactose}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert D-Galactose}}]$$

$$c = (3,300 \times 342,3 \text{ (bzw. } 360,32) \times \Delta E) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{1,793 \text{ (bzw. } 1,887) \times \Delta E \text{ [g/l Lactose (bzw. Lactose-monohydrat)]}}$$

$$c = (3,300 \times 180,16 \times \Delta E) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,9437 \times \Delta E \text{ [g/l D-galactose]}}$$

Lactose via D-Galactose Ansatz⁹

Wenn die Probe keine freie D-Galactose enthält, wird auf die Bestimmung von D-Galactose verzichtet. Sollte freie D-Galactose in der Probe doch vorhanden sein, dann wird sie als Lactose berechnet.

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

$$c = (3,300 \times 342,3 \text{ (bzw. } 360,32) \times \Delta E) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{1,793 \text{ (bzw. } 1,887) \times \Delta E \text{ [g/l Lactose (bzw. Lactose-monohydrat)]}}$$

Die Berechnung der Ergebnisse kann erfolgen als wasserfreie Lactose oder als Lactose-monohydrat (wie in der traditionellen Analyse). Wurde bei der Vorbereitung der Probe eine Verdünnung vorgenommen, muss das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor F multipliziert werden. Bei der Analyse von Proben, die für die Analyse eingewogen werden, wird das Ergebnis auf die Einwaage bezogen.

Eigenschaften des Tests

- Spezifität:** Spezifisch für Lactose unter Testbedingungen. Relativ spezifisch für D-Galactose in Abwesenheit von L-Arabinose. Bei der Analyse von handelsüblichem Lactose-monohydrat und von D-Galactose sind Ergebnisse von < 100 % zu erwarten, da die Substanzen feuchtigkeitsempfindlich sind.
- Empfindlichkeit:** 2 mg Lactose /l (ΔE=0,005; v=0,500 ml ; V=3,300 ml)
1 mg D-Galactose /l (ΔE=0,005; v=0,500 ml ; V=3,300 ml)
- Nachweisgrenze:** 7 mg Lactose/l (ΔE=0,020; v=0,500 ml; V=3,300 ml)
4 mg D-Galactose/l (ΔE=0,020; v=0,500 ml; V=3,300 ml)
- Linearität:** 4 µg Lactose+ D-Galactose/test (v = 0,500 ml; V = 3,300 ml)
bis 200 µg Lactose + D-Galactose/test (v = 0,100 ml; V = 3,300 ml)
- Präzision:** Δ E = 0,005 – 0,010 Ektinktionseinheiten (D-Galactose),
Δ E = 0,010 – 0,015 Ektinktionseinheiten (Lactose)
CV = ca. 1 bis 2 % (Lactose, D-Galactose)

Hinweise

- Das Mitführen eines "Standards" dient ausschließlich zur Erkennung von Unregelmäßigkeiten in der Analyse. Die Messung des Standards wird nicht benötigt zur Berechnung der Ergebnisse.
- Dieser Ansatz zusammen mit dem Leerwert ist eine "Einzelbestimmung".
- Im Fall einer "Doppelbestimmung" werden 2 Ansätze mit verschiedenen Probevolumina ausgeführt. Die gemessenen Extinktionsdifferenzen müssen den eingesetzten Probevolumina proportional sein. Ergebnisse mit den entsprechenden Probevolumina v berechnen.
- Wiederfindung = $[(\Delta E_{\text{Probe+Standard}} - \Delta E_{\text{Probe}}) / \Delta E_{\text{Standard}}] \times 100 \text{ [%]}$
- In der Spurenanalytik wird empfohlen, das Probevolumen bis zu 0,500 ml zu erhöhen (0,007 bis 0,4 g Lactose/l).
- Vor der Dosierung Enzympipetten, bzw. Spitzen der Kolbenhubpipetten mit Probe- bzw. Standardlösung mehrfach vorspülen.
- z. B. mit einem Plastikspatel, oder durch Umschwenken nach Verschließen der Küvette mit Parafilm (Warenzeichen der American Can Co., Greenwich Ct., USA).
- Die Reaktion ist beendet wenn die gemessene Extinktion konstant ist. Ist dies nicht der Fall, weiter in Abständen von 5 min messen, bis die Extinktionszunahme konstant ist. Extinktionen auf die Zeit der Zugabe von β-Galactose-Dehydrogenase (Suspension # 4) extrapolieren.
- Viele Lebensmittel enthalten keine freie D-Galactose, deswegen wird auf die Bestimmung von D-Galactose verzichtet; sollte freie D-Galactose in der Probe doch vorhanden sein, dann wird sie als Lactose berechnet.