

Isolierung der Proteinfraction aus Milch zur Analyse der Stabilisotopenverhältnisse

Positionspapier der Arbeitsgruppe Stabilisotopenanalytik

Stand: Februar 2020

Die Bekämpfung von Lebensmittelverfälschungen und Lebensmittelbetrug erfährt zunehmend größere Aufmerksamkeit. Neben operativen Prüfungen, wie Rückverfolgung oder Betriebskontrollen, stellen chemisch-analytische Methoden ein wichtiges Element bei der Authentizitätsprüfung von Lebensmitteln dar. Hierbei kommt seit Jahren die Stabilisotopenmassenspektrometrie (IRMS) zum Einsatz [1,2].

Die Effektivität der angewandten Untersuchungsmethoden hängt wesentlich von der Qualität der zur Beurteilung eingesetzten Vergleichsdaten und der Qualität der Analyseverfahren ab. Akkreditierte Prüflaboratorien müssen die Anforderungen der Norm DIN EN ISO/IEC 17025 erfüllen [3]. Unter vielen anderen Punkten ist darin die regelmäßige und erfolgreiche Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen vorgeschrieben.

Die Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchungen im Bereich der IRMS bestätigen die laborübergreifende Vergleichbarkeit der Messergebnisse für diese Analysenmethode. Die angebotenen Laborvergleichsuntersuchungen betreffen jedoch häufig nur die reine Analyse einer Lebensmittelmatrix ohne Probenvorbereitung. In der Praxis ist dabei üblicherweise eine mehr oder weniger umfangreiche Probenvorbereitung vorangestellt, die die Vergleichbarkeit der Messergebnisse beeinflussen kann.

Die Zusammenführung von Untersuchungsergebnissen in laborübergreifenden Datenbanken verlangt robuste Aufarbeitungsmethoden. Dabei kann die Verwendung einer einheitlichen Probenvorbereitungsmethode zu einer Verbesserung der Vergleichbarkeit der Analyseergebnisse führen. Für verschiedene Lebensmittel wie z. B. Wein, Fruchtsaft oder Essig liegen Standardmethoden vor [4-10]. Aber es besteht weiterer Bedarf an Probenvorbereitungsmethoden, die laborübergreifend entwickelt und eingesetzt werden.

Die Arbeitsgruppe Stabilisotopenanalytik der Lebensmittelchemischen Gesellschaft prüfte im Rahmen von Vergleichsuntersuchungen eine Aufarbeitungsmethode zur Isolierung der Proteinfraction aus Milch, um darin die Stabilisotopenverhältnisse von Kohlenstoff ($\delta^{13}\text{C}$), Stickstoff ($\delta^{15}\text{N}$), Wasserstoff ($\delta^2\text{H}$) und Schwefel ($\delta^{34}\text{S}$) zu bestimmen. Anhand der gleichen Milchprobe wurde zudem die Vergleichbarkeit der Stabilisotopenanalyse der Fettfraktion ($\delta^{13}\text{C}$ und $\delta^2\text{H}$) bzw. der Wasserfraktion ($\delta^{18}\text{O}$ und $\delta^2\text{H}$) untersucht. Die Vergleichsuntersuchungen erfolgten in zwei Runden.

Voruntersuchungen 2016

Zunächst wurde eine Milchprobe unter Einsatz der laboreigenen Verfahren analysiert. Erfragt wurden die Ergebnisse der Stabilisotopenanalyse der Protein-, der Fett- und der Wasserfraktion der Milch.

Proteinfraction ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{34}\text{S}$)

Die Standardabweichungen der Ergebnisse für $\delta^{15}\text{N}$, und $\delta^{34}\text{S}$ waren gegenüber den Standardabweichungen bei reiner Messung ohne Aufarbeitung kaum angestiegen, wohingegen

die Standardabweichung für $\delta^{13}\text{C}$ erhöht und für $\delta^2\text{H}$ deutlich erhöht war. Die Ergebnisse zeigten, dass die verwendete Aufarbeitungsmethode, insbesondere die Vorgehensweise zur Entfettung, einen Einfluss auf den $\delta^{13}\text{C}$ - bzw. $\delta^2\text{H}$ -Wert der Proteinfraction hat. Von daher wurde entschieden, die Vergleichsuntersuchungen mit einer einheitlich vorgegebenen Methode zur Isolierung der Proteinfraction zu wiederholen.

Fett- und Wasserfraktion ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^2\text{H}$)

Von einigen Teilnehmern erfolgte die Isotopenanalyse der Wasser- sowie der Fettfraktion der Milch. Für die Elemente Sauerstoff ($\delta^{18}\text{O}$) und Wasserstoff ($\delta^2\text{H}$) in der Wasserfraktion standen fünf bzw. drei Ergebnisse zur Auswertung zur Verfügung. Für den Parameter Kohlenstoff ($\delta^{13}\text{C}$) in der Fettfraktion wurden fünf Ergebnisse eingereicht. Die Standardabweichungen der Ergebnisse lagen im erwarteten Bereich und waren gegenüber der Streuung bei der Analyse ohne Aufarbeitung nur wenig erhöht, sodass auch in der folgenden Vergleichsuntersuchung 2017 die hauseigenen Routinemethoden verwendet wurden.

Vergleichsuntersuchungen 2017

An den beschriebenen Vergleichsuntersuchungen nahmen sechs Labore teil. Für die Elemente Kohlenstoff und Stickstoff der Proteinfraction wurden von allen Laboren Ergebnisse geliefert, für die weiteren Elemente stand eine geringere Zahl an Ergebnissen zur Auswertung zur Verfügung ($n = 3$ bis 5).

Probenmaterial, Probenvorbereitung, Untersuchungsparameter

5 Liter UHT-Milch (Fettgehalt 3,5 %) wurden in 0,5-L-Portionen in sterile Kunststoffbehälter abgefüllt und zur Analyse verteilt. Die Proteinfraction sollte nach vorgegebener Aufarbeitungsmethode gewonnen und darin die Isotopenverhältnisse von C, N, H und S bestimmt werden. In der Fettfraktion sollte die Bestimmung der Isotopenverhältnisse von C und H, in der Wasserfraktion die Bestimmung der Isotopenverhältnisse von O und H erfolgen. Hierfür wurden keine Methoden vorgegeben. Die IRMS-Messungen erfolgten nach den laboreigenen Routinemethoden.

Isolierung der Proteinfraction

Etwa 100 g Milch wurden zur Proteinfällung in einem 250 ml Becherglas mit 1 N HCl auf einen pHWert von 4,3 eingestellt, in ein Zentrifugenglas überführt und zentrifugiert (10 min bei 2200 x g. Der Überstand wurde abdekantiert und verworfen. Der Rückstand wurde mit jeweils 100 ml entmineralisiertem Wasser zwei Mal gewaschen (Aufrühren des Rückstands und Zentrifugation). Zur Entfettung wurde der Rückstand anschließend zwei Mal mit je 100 ml Aceton und anschließend mit 100 ml Petrolether gewaschen (Aufrühren und Zentrifugation des Rückstands bei jedem Waschgang). Der Rückstand (Proteinfraction) verblieb über Nacht im Zentrifugenglas, um das Lösungsmittel abdampfen zu lassen. Anschließend wurde der Rückstand fein vermahlen und in dieser Form zur Messung eingesetzt.

Ergebnisse

Proteinfraction

Die Ergebnisse der beschriebenen Vergleichsmessungen weisen für $\delta^{15}\text{N}$ und $\delta^{34}\text{S}$ Standardabweichungen auf, die im gleichen Rahmen wie bei Laborvergleichsmessungen ohne vorherige Aufarbeitung liegen (Tabelle 1). Für $\delta^{13}\text{C}$ und $\delta^2\text{H}$ sind die Standardabweichungen

gegenüber der direkten Messung von Casein leicht erhöht. Laborvergleichsmessungen von isoliertem Casein ergaben eine Standardabweichung von 0,2 ‰ für Kohlenstoff, 2,8 ‰ für Wasserstoff, 0,3 ‰ für Stickstoff bzw. 0,5 ‰ für Schwefel [11].

Tabelle 1 Ergebnisse der Runde 2017, Proteinfraction

	$\delta^{13}\text{C}$ [‰] vs. V-PDB	$\delta^{15}\text{N}$ [‰] vs. Air	$\delta^{34}\text{S}$ [‰] vs. V-CDT	$\delta^2\text{H}$ [‰] vs. V-SMOW
Mittelwert	-22,4	5,9	4,9	-108
Median	-22,4	5,9	5,0	-106
Standardabweichung	0,5	0,2	0,6	4,2
N (Anzahl)	6	6	4	4

Fett- und Wasserfraktion

Die Ergebnisse der Vergleichsuntersuchungen 2017 bestätigten die Ergebnisse der Voruntersuchungen 2016. Die Standardabweichungen lagen im erwarteten Bereich und waren gegenüber der reinen Analyse ohne Aufarbeitung kaum erhöht (Tabelle 2). Der Einfluss der Probenvorbereitung auf die Ergebnisse der IRMS-Analyse der Fett- bzw. Wasserfraktion von Milch lässt sich von daher als gering bewerten.

Tabelle 2 Ergebnisse der Runde 2017, Fett- und Wasserfraktion

	Wasserfraktion		Fettfraktion	
	$\delta^{18}\text{O}$ [‰] vs. V-SMOW	$\delta^2\text{H}$ [‰] vs. V-SMOW	$\delta^{13}\text{C}$ [‰] vs. V-PDB	$\delta^2\text{H}$ [‰] vs. V-SMOW
Mittelwert	-5,7	-43	-25,1	-222
Median	-5,7	-43	-25,0	-221
Standardabweichung	0,2	1,0	0,2	3,7
N (Anzahl)	4	3	5	4

Fazit

Für die Analyse der Proteinfraction von Milch muss das Milchfett abgetrennt werden. Hierfür ist eine reproduzierbare Entfettung Voraussetzung, ansonsten werden insbesondere die Isotopenverhältnisse von Kohlenstoff und Wasserstoff beeinträchtigt, während Stickstoff und Schwefel wenig betroffen sind. Ohne Anwendung einer einheitlichen Methode sind die Ergebnisse teilweise nicht in ausreichendem Maße vergleichbar.

Im Zuge der Vergleichsuntersuchung 2017 wurde eine Aufarbeitungsmethode zur Isolierung und Entfettung der Proteinfraction von Milch laborübergreifend geprüft. Die Ergebnisse der Stabilisotopenanalyse zeigten eine gute Übereinstimmung und damit die Eignung der vorgegebenen Methode für die Gewinnung der Proteinfraction.

Auch die Stabilisotopenanalyse der Fett- und Wasserfraktion von Milch mit hauseigenen Routinemethoden ergab reproduzierbare Ergebnisse, deren Standardabweichungen mit denen bisheriger Laborvergleichsuntersuchungen vergleichbar sind.

Die Ergebnisse sollen in weiterführenden Untersuchungen mit einem größeren Teilnehmerkreis geprüft werden. In einem weiteren Schritt ist zudem die Etablierung einer standardisierten Methode zur Bestimmung der Stabilisotopenverhältnisse der Fett- und Wasserfraktion von Milch

geplant. Generell ist die Entwicklung einheitlicher IRMS-Analyseverfahren fortzuführen. Im Dezember 2019 wurde auf Basis des § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches eine Arbeitsgruppe für IRMS-Analytik gegründet. Die am Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit angesiedelten „§64-Arbeitsgruppen“ befassen sich mit der Erarbeitung, Festlegung und Standardisierung von Untersuchungsmethoden.

Literatur

- [1] Camin F, Boner M, Bontempo L, Fauhl-Hassek C, Kelly SD, Riedl J, Rossmann A (2017). Stable isotope techniques for verifying the declared geographical origin of food in legal cases. Trends in Food Science & Technology, 61, 176-187.
- [2] Zhao Y, Zhang B, Chen G, Chen A, Yang S, Zhihua Y (2014) Recent developments in application of stable isotope analysis on agro-product authenticity and traceability. Food Chemistry 145, 300-305.
- [3] Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC 17025:2017)
- [4] OIV-MA-AS312-06. Determination by isotope ratio mass spectrometry $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of wine ethanol or that obtained through the fermentation of musts, concentrated musts or grape sugar (Oeno 17/2001).
- [5] OIV-MA-AS2-12:R2009. Methods for $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ isotope ratio determination of water in wines and must (Oeno 1/2006).
- [6] CSN ENV 12140:1996. Fruit and vegetable juices - Determination of the stable carbon isotope ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of sugars from fruits juices - Method using isotope ratio mass spectrometry.
- [7] ENV 13070. Fruit and vegetable juices. Determination of the stable carbon isotope ratio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in the pulp of fruit juices. Method using isotope ratio mass spectrometry. 1998.
- [8] DIN EN 16466-2:2013-03. Essig - Isotopenanalyse von Essigsäure und Wasser - Teil 2: ^{13}C IRMS-Analyse von Essigsäure; Deutsche Fassung EN 16466-2:201
- [9] OIV_OENO 510-2013 Method for $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio determination of acetic acid in wine vinegar by isotopic mass spectrometry.
- [10] OIV_OENO 511-2013 Method for $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ isotope ratio determination of water in wine vinegar by isotopic mass spectrometry.
- [11] Positionspapier der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (2018) Intra and inter laboratory reference materials for multi element stable isotope analysis in food authentication Lebensmittelchemie.72: 75-77.
https://www.gdch.de/fileadmin/downloads/Netzwerk_und_Strukturen/Fachgruppen/Lebensmittelchemiker/Arbeitsgruppen/stabilisotopen/posi_stabil_casein_2018.pdf (aufgerufen am 27.01.2020)