

**Bestimmung des Gehaltes an säurelöslichem  
 $\beta$ -Laktoglobulin in hitzebehandelter Milch**  
Umkehrphasen-hochleistungs-flüssigchromatographisches  
Verfahren

**DIN**  
**10473**

ICS 67.100.10

Deskriptoren: Lebensmittelprüfung, Milch, Prüfverfahren, Gehaltsbestimmung, Laktoglobulin

Determination of acid soluble  $\beta$ -lactoglobulin content of heat-treated milk —  
Reversed phase high performance liquid chromatographic method

Dosage de la teneur en  $\beta$ -lactoglobuline soluble dans l'acide du lait traité thermiquement —  
Phases renversées — Méthode par chromatographie liquide haute performance

## Vorwort

Diese Norm wurde vom Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte, Arbeitsausschuß "Chemische und physikalische Milchuntersuchung", erarbeitet.

Anhang A ist normativ und Anhang B ist informativ.

## 1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Umkehrphasen-hochleistungs-flüssigchromatographisches Verfahren (RP-HPLC-Verfahren) zur Bestimmung des Gehaltes an säurelöslichem  $\beta$ -Laktoglobulin in hitzebehandelter Milch fest.

Es ist anwendbar für die Unterscheidung von ultrahocherhitzter Milch (UHT-Milch) und in Flaschen sterilisierter Milch. Das Verfahren ist für den Bereich von 0 mg bis 500 mg  $\beta$ -Laktoglobulin je Liter Milch einsetzbar.

## 2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation.

DIN 10327

Milch und Milchprodukte — Probenahmetechnik

DIN 10334

Bestimmung des Stickstoffgehaltes von Milch nach Kjeldahl und Berechnung des Rohproteingehaltes

DIN ISO 5725

Präzision von Meßverfahren — Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision von festgelegten Meßverfahren durch Ringversuche;  
Identisch mit ISO 5725 : 1986

## 3 Prinzip

Bei einem pH-Wert von 4,6 wird das Casein und das denaturierte Molkeneiweiß isoelektrisch gefällt. Die Sauermolke wird durch Zentrifugieren und Filtrieren abgetrennt. Aus der Sauermolke wird mit einem RP-HPLC-Verfahren der Gehalt an säurelöslichem  $\beta$ -Laktoglobulin bestimmt.

## 4 Chemikalien und Referenzmaterialien

### 4.1 Allgemeines

Es sind analysenreine Chemikalien zu verwenden. Das verwendete Wasser muß destilliert oder mindestens von entsprechender Reinheit sein.

### 4.2 $\beta$ -Laktoglobulin, genetische Varianten A und B

**4.3 Kontrollprobe**, gefriergetrocknete rohe Sammelmilch mit einem bekannten Gehalt an säurelöslichem  $\beta$ -Laktoglobulin

ANMERKUNG: Wenn die gefriergetrocknete Kontrollprobe bei Temperaturen zwischen 0 °C und 4 °C trocken aufbewahrt wird, ist sie bis zu 6 Monate verwendbar. Die Rohmilchen haben im Mittel etwa 3 400 mg  $\beta$ -Laktoglobulin je Liter rekonstituierter Milch.

### 4.4 Verdünnte Salzsäure, $c$ (HCl) = 2 mol/l

ANMERKUNG: Bei der Ansäuerung (siehe 7.1) kann die Volumenveränderung durch Verwendung einer Salzsäure  $c$  (HCl) = 4 mol/l reduziert werden.

Fortsetzung Seite 2 bis 7

Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

#### 4.5 Phosphat-Pufferlösung, pH = 6,7

57 ml einer Natriumdihydrogenphosphat-Lösung ( $c(\text{NaH}_2\text{PO}_4) = 0,2 \text{ mol/l}$ ) und 43 ml einer Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung ( $c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,2 \text{ mol/l}$ ) werden auf 200 ml Wasser verdünnt.

#### 4.6 Wasser, geeignet für HPLC

ANMERKUNG: Die Verwendung von unzureichend im Labor aufbereitetem Wasser kann zu Kontamination der Säulen und zu verminderter Auflösung führen.

#### 4.7 Acetonitril, geeignet für HPLC

#### 4.8 Trifluoressigsäure, geeignet für HPLC

ANMERKUNG: Nicht ausreichend reine oder unsachgemäß gelagerte Trifluoressigsäure kann zu einem Verschwinden einiger Peaks oder zu schlechter Auflösung des Spektrums führen.

### 5 Geräte und Hilfsmittel

Übliche Laboratoriumsgeräte und insbesondere die folgenden:

**5.1 pH-Meter**, kalibriert für einen Bereich zwischen pH = 4,0 und pH = 7,0

**5.2 Zentrifuge** mit einer wirksamen Zentrifugalbeschleunigung von 2 000 g

**5.3 Zentrifugengläser**, Nennvolumen etwa 30 ml

**5.4 Glasflaschen**, verschließbar mit einem Nennvolumen von etwa 5 ml

**5.5 Glastrichter**, mit einem Durchmesser von etwa 7 cm

**5.6 Faltenfilter** mit einem Durchmesser von etwa 11 cm mit hoher Filtrationsgeschwindigkeit

**5.7 Reagenzgläser**, Nennvolumen etwa 30 ml

**5.8 Vollpipetten**, Nennvolumen 1 ml, 2 ml und 5 ml

**5.9 Bechergläser**, Nennvolumen 50 ml und 100 ml

**5.10 Meßkolben**, Nennvolumen 10 ml, 20 ml, 25 ml und 50 ml

**5.11 Mikrofiltrationsvorrichtung** mit Membranfiltern mit einer Porengröße von 0,22 µm

**5.12 Analysenwaage**

**5.13 Magnetrührer**

#### 5.14 HPLC-Ausrüstung

Eine aus folgenden Teilen bestehende Ausrüstung zur Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie:

**5.14.1 Pulsationsfreie Pumpe**, die zur Erzeugung eines stetigen Flüssigkeitsstroms von 1,0 ml/min geeignet ist und bei einem Druck von 200 bar arbeitet

**5.14.2 Manuelles oder automatisches Einspritzsystem**, das für Injektionen von 20 µl geeignet ist

**5.14.3 Säulenheizung**, regelbar bis zu einer Temperatur von 40 °C

**5.14.4 Ultraviolett-Detektor** mit einer Wellenlänge von 205 nm

**5.14.5 Elektronischer Integrator oder computergestütztes Datenverarbeitungssystem** geeignet zum Messen des Peakbereiches

**5.14.6 Analytische (Umkehrphasen-) Trennsäule<sup>1)</sup>** mit Füllung aus Polystyroldivinylbenzol, Korngröße 8 µm, Porengröße 30 nm und den Maßen 150 mm × 4,6 mm

### 6 Probenahme

Nach DIN 10327.

Bei abgepackter UHT-Milch oder in Flaschen sterilisierter Milch sind bestehende offizielle Probenahmevorschriften zu beachten (siehe Anhang B). Die Packungen sind unmittelbar zur Probenvorbereitung zu öffnen. Es ist darauf zu achten, daß das Mindesthaltbarkeitsdatum der Konsumpackungen noch nicht überschritten ist.

### 7 Durchführung

#### 7.1 Vorbereitung der Probe und Säurefällung

Die als Probe entnommene Packung wird vor dem Öffnen durch Stürzen und Schütteln sorgfältig gemischt. Nach dem Öffnen werden 50 ml der Milch mit einem Meßzylinder abgemessen und in ein 100-ml-Becherglas übergeführt.

Der pH-Wert wird durch tropfenweise Zugabe von verdünnter Salzsäure (siehe 4.4) unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer (siehe 5.13) auf pH = 4,6 eingestellt. Anschließend wird die aufbereitete Probe im Becherglas 20 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Mit einem Teil des Inhalts wird ein Zentrifugenglas (siehe 5.3) gefüllt, welches anschließend 20 min bei 2 000 g in der Zentrifuge (siehe 5.2) zentrifugiert wird. Das Zentrifugat wird über einen Faltenfilter (siehe 5.6) filtriert und in einem Reagenzglas gesammelt. Das unverdünnte Filtrat ist bei Aufbewahrung bei einer Temperatur von 0 °C bis 4 °C 24 h verwendbar und tiefgefroren bei – 18 °C zwei Wochen lagerbar.

Einmal aufgetaute Filtrate dürfen nicht erneut tiefgefroren werden.

#### 7.2 Vorbereitung der Probenlösung

Aufgetaute Filtrate werden vor der Weiterverwendung sorgfältig gemischt. 2 ml des Filtrats einer UHT-Milch bzw. 5 ml des Filtrats einer sterilisierten Milch werden in ein 10-ml-Meßkolben pipettiert, der anschließend mit Phosphat-Pufferlösung (siehe 4.5) aufgefüllt wird.

Anschließend wird der Inhalt des Meßkolbens durch Schütteln und Stürzen gründlich gemischt und 1 h stehengelassen. Nach erneutem Mischen wird die Probenlösung mit der Mikrofiltrationsvorrichtung (siehe 5.11) filtriert, wobei der erste Milliliter des Filtrats verworfen wird und 5 ml des verbleibenden Filtrats in einer Glasflasche (siehe 5.4) übergeführt werden.

Die Probenlösung ist bei Aufbewahrung bei einer Temperatur von 0 °C bis 4 °C 24 h verwendbar.

<sup>1)</sup> Auskunft über geeignete Säulen und deren Bezugsquellen erteilt: Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V., 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin)

### 7.3 Vorbereitung der Kontrollprobe

2,50 g der Kontrollprobe (siehe 4.3) werden auf 0,01 g in ein 50-ml-Becherglas eingewogen. Es werden 10 ml auf 40 °C erwärmtes Wasser zugegeben und mit einem Rührstab gerührt, um die vorhandenen Klumpen aufzulösen.

Die derart rekonstituierte Milch wird quantitativ in einen 25-ml-Meßkolben übergeführt. Der Meßkolben wird mit Wasser aufgefüllt und der Inhalt durch Schütteln gemischt. Anschließend wird die rekonstituierte Milch vollständig in ein 50-ml-Becherglas übergeführt und nach 7.1 einer Säurefällung unterzogen.

### 7.4 Vorbereitung der Kontrollprobenlösungen für die Mehrpunkt-Kalibrierung

Aufgetaute Filtrate werden vor der Weiterverwendung sorgfältig gemischt. 2 ml Filtrat werden in einen 20-ml-Meßkolben pipettiert, der anschließend mit Phosphat-Pufferlösung (siehe 4.5) aufgefüllt wird.

Anschließend wird der Inhalt des Meßkolbens durch Schütteln und Stürzen gründlich gemischt.

Unmittelbar anschließend werden 1 ml, 2 ml und 5 ml dieser Lösung in drei verschiedene 10-ml-Meßkolben pipettiert, die anschließend mit Phosphat-Pufferlösung (siehe 4.5) aufgefüllt werden. Nach dem Verschließen wird der Inhalt der Meßkolben durch Schütteln und Stürzen gründlich gemischt.

Die erhaltenen Kontrollproben-Lösungen (Ausgangslösung und die drei Verdünnungen) werden mit der Mikrofiltrationsvorrichtung (siehe 5.11) filtriert, wobei der erste Milliliter der erhaltenen Filtrate verworfen wird.

Die so erhaltenen Verdünnungen entsprechen den folgenden Volumenverhältnissen Kontrollprobe: Verdünnung

- a) 1 ml : 100 ml
- b) 1 ml : 50 ml
- c) 1 ml : 20 ml
- d) 1 ml : 10 ml

### 7.5 Vorbereitung der Kontrollprobenlösung für die Einpunkt-Kalibrierung

Es ist eine Kontrollprobenlösung herzustellen, deren Peakfläche bis auf  $\pm 20$  % der Peakflächen der zu vermessenen Probenlösung entspricht.

Kontrollprobenlösungen mit einer  $\beta$ -Laktoglobulin-Massenkonzentration unter 50 mg/l sollten nicht verwendet werden. In der Regel ist die Verdünnung b) (1 ml : 50 ml) für die quantitative Bestimmung von  $\beta$ -Laktoglobulin in Flaschen sterilisierter Milch und UHT-Milch geeignet.

## 7.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

### 7.6.1 Fließmittel

Folgende Fließmittel werden in variablen Volumenverhältnissen (siehe Tabelle 1) eingesetzt.

Fließmittel A: 0,1 Volumenanteile Trifluoressigsäure in 99,9 Volumenteilen Wasser

Fließmittel B: 0,1 Volumenanteile Trifluoressigsäure in 99,9 Volumenteilen Acetonitril

### 7.6.2 Fließmittelgradienten und HPLC-Trennbedingungen

Folgender in Tabelle 1 dargestellter Fließmittelgradient hat sich bewährt:

Tabelle 1

| Zeit<br>min | Fließmittel A<br>Volumenanteil in<br>% | Fließmittel B<br>Volumenanteil in<br>% |
|-------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| 0           | 65                                     | 35                                     |
| 1,0         | 65                                     | 35                                     |
| 8,0         | 62                                     | 38                                     |
| 16,0        | 58                                     | 42                                     |
| 22,0        | 54                                     | 46                                     |
| 22,5        | 0                                      | 100                                    |
| 23,0        | 0                                      | 100                                    |
| 23,5        | 65                                     | 35                                     |

ANMERKUNG: Eine geringfügige Änderung des Fließmittelgradienten kann erforderlich sein, um die in Bild A.1 dargestellte Auflösung zu erreichen.

Weitere HPLC-Bedingungen:

Fließgeschwindigkeit: 1,00 ml/min

Säulentemperatur: 40 °C

Die Zeitspanne zur Erreichung des Gleichgewichts ist zu überprüfen, wenn sich der vom Detektor angezeigte Wert am Ende des Durchlaufs wieder auf dem Niveau des Ausgangswertes (Basislinie) stabilisiert hat. In der Regel reicht ein isokratischer Fluß von 15 min.

### 7.6.3 Injektionsvolumen

Es werden 20 µl injiziert.

### 7.6.4 Herstellen der Gleichgewichtsbedingungen der analytischen Trennsäule

Wird das System täglich neu gestartet, ist die Säule für 5 min bis 10 min mit Fließmittel B zu spülen. Anschließend sind die Ausgangsbedingungen aus Tabelle 1 (Zeit: 0 min) herzustellen und für 15 min zu halten. Mit einer Injektion von Phosphat-Pufferlösung (siehe 4.5) wird ein Blinndurchlauf durchgeführt.

Zur längeren Lagerung wird die analytische Trennsäule mit einer Mischung aus 70 Volumenteilen Acetonitril mit 30 Volumenteilen Wasser gespült.

### 7.6.5 Bestimmung des $\beta$ -Laktoglobulin-Gehaltes

Um eine Verschiebung der Basislinie zu verhindern und konstante Retentionszeiten zu erhalten, sind bei der Durchführung einer Reihe von HPLC-Analysen konstante Zeitabstände zwischen den Durchläufen einzuhalten.

Bei jeder Analysenreihe ist eine Mehrpunkt- oder eine Einpunkt-Kalibrierung durchzuführen. Nach Durchlauf von jeweils 10 bis 15 Proben ist jeweils eine Kontrollprobenlösung zur Bewertung des Responsefaktors zu injizieren. Falls erforderlich, ist erneut zu kalibrieren. Dazu wird entweder eine Einpunkt- oder eine Mehrpunkt-Kalibrierung vorgenommen.

In regelmäßigen Abständen ist eine Mehrpunkt-Kalibrierung zur Überprüfung des Responsefaktors erforderlich. Vor der Injektion einer Probe mit sehr niedrigen  $\beta$ -Laktoglobulin-Gehalt (z. B. sterilisierte Milch) ist ein Blinndurchlauf vorzunehmen, damit die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Memory-Effekts minimiert wird.

Die analytische Trennsäule ist alle 20 bis 25 Durchläufe mindestens 30 min mit Fließmittel B zu spülen.