

**Zeitschrift:** Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène  
**Band:** 92 (2001)  
**Heft:** 6

**Artikel:** Mikrotiterplatten-Test zur quantitativen Bestimmung von Wasserstoffperoxid in Milch  
**Autor:** Walser, Paul Eugen / Herzog, Rosmarie  
**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-981932>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 19.11.2024

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

# Mikrotiterplatten-Test zur quantitativen Bestimmung von Wasserstoffperoxid in Milch

Paul Eugen Walser und Rosmarie Herzog, Chemisches Laboratorium des Kantons Graubünden, Chur

Eingegangen 13. August 2001, angenommen 23. Oktober 2001

## Einleitung

Untersuchungsmethoden im Mikrotiterplatten-Format (MT) ermöglichen einen hohen Probendurchsatz auf kleinem Raum und die Automatisierung der Analyse mit standardisierten Laborgeräten. Verschiedene Bestimmungsmethoden mit photometrischer Detektion lassen sich für die Untersuchung von Rohmilch – nötigenfalls nach geringfügigen Anpassungen – auf MT-Verfahren applizieren: Keimzahlbestimmung (1), Hemmtest auf Antibiotika (2), Proteingehalt nach Bradford (3), Phosphatase (4), Lactoperoxidase mit Klärungsreagenz (5) und immunologische Milchartenbestimmungen (6, 7).

Wasserstoffperoxid eignet sich aufgrund seiner geringen Toxizität zur Konservierung von Rohmilch (8), um eine Kühlung zu ersetzen. Dieses Verfahren ist in einigen Ländern zugelassen (9), hingegen nicht in der Schweiz und der EU. Dennoch wurde von den Autoren vor kurzem eine missbräuchliche Verwendung festgestellt. Dies könnte damit in Zusammenhang gebracht werden, dass vermehrt Milchprodukte auf dem Hof verarbeitet und verkauft werden. Der wirksame Konzentrationsbereich beträgt 200 bis 1000 mg/l. Durch zusätzliche Zugabe von 30 bis 50 mg/l Rhodanid wird das Lactoperoxidasesystem (10) aktiviert und man benötigt bedeutend weniger Wasserstoffperoxid, wobei das Wirkungsmaximum bei 8 mg/l liegt (11). Das wirksame Bakteriostatikum ist das dabei gebildete Hyporhodanid. Wegen der Aktivität der Lactoperoxidase und in geringem Mass der Katalase erfolgt der Abbau des Wasserstoffperoxids in Rohmilch sehr rasch.

Eine andere Anwendung der Wasserstoffperoxid-Bestimmung ist die Ermittlung von Verunreinigungen von Past- oder UHT-Milch mit wasserstoffperoxidhaltigen Reinigungs- und Desinfektionsmitteln. Auch solche Verunreinigungen

kommen in der Praxis immer wieder vor, wenn Leitungen der Anlagen zu wenig gespült wurden. Dies kann mit sehr grossen mikrobiellen Risiken verbunden sein. Im Fall der UHT-Milch erfolgt der Abbau langsam, weil die Lactoperoxidase inaktiv ist. Eine weitere Quelle von Wasserstoffperoxid in Milch ist ferner dessen mikrobielle Bildung. Die Konzentration erreicht jedoch höchstens etwa 1 mg/l (12).

Verschiedene photometrische Methoden zur Bestimmung von Wasserstoffperoxid in Milch sind vorgeschlagen worden. Direkte Methoden sind die Reaktion mit Rhodanid und Eisensulfat (13) oder Titantrichlorid (14). Ein enzymatisches Verfahren mit Meerrettichperoxidase und o-Dianisidin als Substrat wurde in der Literaturstelle (15) beschrieben. Eine Veränderung der Milchproteine durch Wasserstoffperoxid lässt sich auch nachträglich noch photometrisch nachweisen, wenn das Wasserstoffperoxid bereits nicht mehr nachweisbar ist, sofern der Rohmilch mindestens 200 mg/l Wasserstoffperoxid zugesetzt wurde (16). Die beschriebenen Verfahren scheinen sich jedoch in der Routineanalytik nicht durchgesetzt zu haben. Meistens werden zu diesem Zweck qualitative Teststreifen verwendet, deren Nachweisgrenze 5 mg/l beträgt (17).

Ziel dieser Arbeit war es daher, für diese Anwendung einen kommerziellen MT-Kit, OxyStat (18) zu prüfen, welcher auf einer Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Tetramethylbenzidin als Substrat und Peroxidase als Enzym basiert. Der Kit wird zur Bestimmung des «oxidativen Stresses» über die Summe der Lipid Hydroperoxide in EDTA-Plasma, Serum und anderen klinischen Körperflüssigkeiten eingesetzt.

## **Experimenteller Teil**

### **Proben**

Für die Versuche wurden Roh- und UHT-Milch auf dem lokalen Markt erhoben. Die Proben wurden mit Wasserstoffperoxid in verschiedenen Konzentrationen versetzt, wozu eine Stammlösung von 2 g/l Wasserstoffperoxid in Wasser diente.

### **Reagenzien**

- Wasserstoffperoxid ca. 300 g/l, z.B. Merck 7209. Die genaue Konzentration wurde mittels permanganometrischer Titration ermittelt.
- OxyStat Test-Kit (Biomedica, Wien) inklusive MT-Platte mit 12 achtfach Strips, Fertigreagenzien und Wasserstoffperoxid-Standard (ca. 15 mg/l).
- Carrez-Reagenz I: 20 g Kaliumhexacyanoferrat-II Trihydrat, z.B. Siegfried 162670, in 100 ml Wasser lösen.
- Carrez-Reagenz II: 80 g Zinksulfat Heptahydrat, z.B. Merck 8883, in 100 ml Wasser lösen und wenig Salzsäure 370 g/l bis zum Klarpunkt zusetzen.

## Geräte

- Kolbenhubpipette Research® 100 µl variabel (Eppendorf, Hamburg)
- Mehrkanalkolbenhubpipette Proline® 100 µl variabel, achtfach (Biohit, Helsinki) und Reagenzienwannen
- Mikrotiterplattenreader MR 5000 mit Schüttelfunktion (Dynex Technologies, Sullyfield Circle)
- Orbital-Schüttelinkubator Varishaker für MT-Platten (Dynex Technologies, Sullyfield Circle) oder Vortemp 56 (UniEquip, Martinsried/München)
- Zentrifuge Omnifuge 2,0 RS (Kendro, Zürich)

## Klärung der Probe

5 ml der Milchprobe wurden in einem 10-ml-Zentrifugenröhrchen mit 60 µl Carrez-Reagenz I und 30 µl Carrez-Reagenz II versetzt, gemischt und zentrifugiert. Vom klaren Überstand wurde ein Aliquot in einer 1 ml Deep Well Platte 96fach (Treff, Degersheim) gesammelt, um die Proben anschliessend rationell mit der Mehrkanalpipette auf die MT-Testplatte transferieren zu können. Bei Rohmilchproben muss nach dem Zentrifugieren noch über eine 5 µm Membranfilterkartusche filtriert werden (z.B. Schleicher & Schuell FP030/10).

## Reaktionsansatz

Der Reaktionsansatz entsprach der Testvorschrift des Herstellers: 10 µl Probe oder Standard pro Well als Dreifachbestimmung in die MT-Testplatte dosieren, 100 µl Reagenz A zusetzen, nach 4 s Schütteln bei 450 nm Probenleerwert messen, 100 µl Reagenz ABD zusetzen, 15 min bei 37°C im Schüttelinkubator mit 250 U/min inkubieren, 50 µl Stopplösung zugeben und Extinktionsendwert nach 4 s Schütteln bei 450 nm messen.

Die Berechnung der Resultate erfolgte nach der Gleichung:

$$x \text{ (mg/l)} = F \cdot \text{Standard (mg/l)} \cdot \frac{(\text{Probenendwert} - \text{Probenleerwert}) - (\text{Blindprobenendwert} - \text{Blindprobenleerwert})}{(\text{Standardendwert} - \text{Standardleerwert})}$$

F = 1,018 (Verdünnungsfaktor für die Carrez-Fällung)

Proben mit einem Gehalt von mehr als 40 mg/l sind vorher mit Wasser zu verdünnen.

## Resultate

Zur Überprüfung des im Kit vorhandenen Standards wurden auch Wasserstofflösungen in Wasser (Abb. 1) und in Wasser nach Carrez-Fällung (Abb. 2) gemessen. Es wurden lineare Regressionsgeraden von den Mittelwerten erhalten, wobei die an verschiedenen Tagen ermittelten Messpunkte graphisch übereinander gelagert wurden. Das Bestimmtheitsmass war in jedem Fall besser als  $R^2 = 0,998$ .

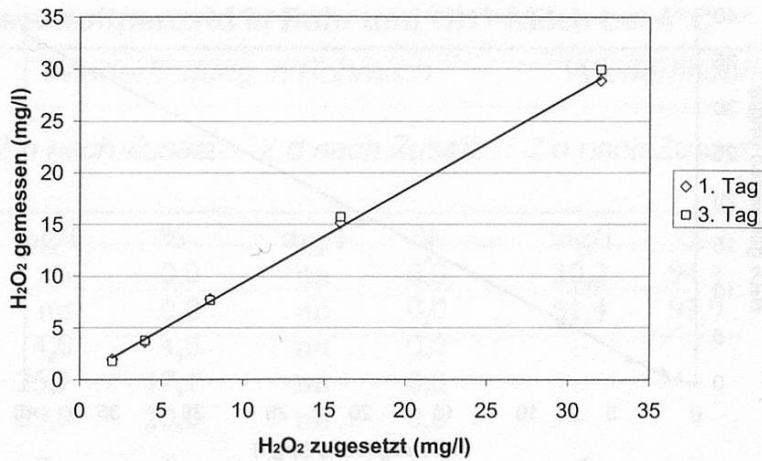


Abbildung 1 **Linearität der Wasserstoffperoxidbestimmung in Wasser** (zwei unabhängige Messungen an zwei Tagen)

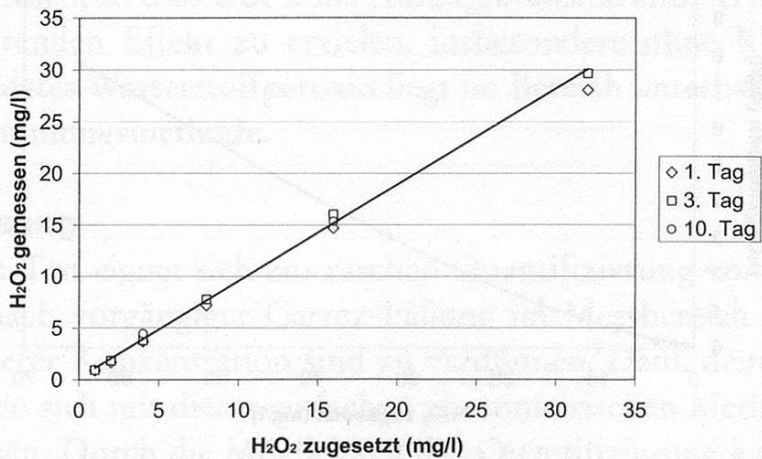


Abbildung 2 **Linearität der Wasserstoffperoxidbestimmung in Wasser nach Carrez-Fällung** (drei unabhängige Messungen an drei Tagen)

Die Wiederfindung in UHT-Milch ist in Abbildung 3 dargestellt, wobei die Messung maximal 2 h nach Herstellung der aufgestockten Proben erfolgte.

Dieselben Proben wurden auch nach Lagerung während zwei Tagen bei 4°C im Kühlschrank untersucht (Abb. 4). Im Weiteren wurde auch die Wiederfindung in Rohmilch und nach Lagerung bei 4°C im Kühlschrank bestimmt und mit der Stabilität in UHT-Milch verglichen (Tabelle 1).

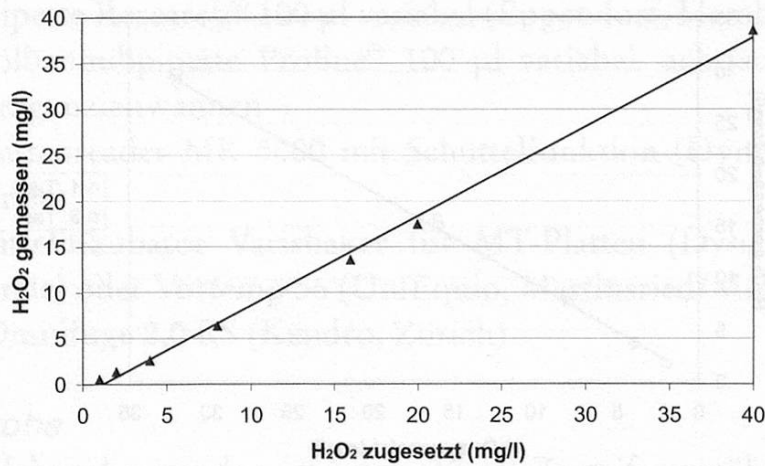


Abbildung 3 **Linearität der Wasserstoffperoxidbestimmung in UHT-Milch**

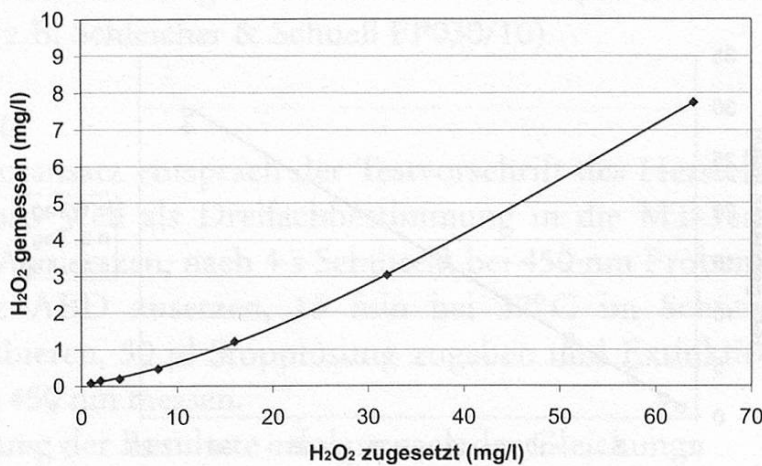


Abbildung 4 **Abbau des Wasserstoffperoxids in UHT-Milch nach zwei Tagen bei 4°C**

### Diskussion

In UHT-Milch wurde im Wesentlichen dieselbe Regressionsgerade wie in Wasser oder in Wasser mit Carrez-Fällung erhalten. In Wasser betrug die Steigung 0,90, nach der Fällung 0,93 und in UHT-Milch 0,97. Aus der Regressionsgeraden in Abbildung 3 ergab sich eine Nachweisgrenze von 3,2 mg/l ( $3 s_{yx}$ ). Der leicht negative Achsenabschnitt von -1,2 mg/l liess auf eine kleine Grundzehrung durch die Reaktion mit Sulphydrylgruppen der Eiweisse schliessen (10). Erst nach längerer Lagerung trat ein deutlicher Abfall des Wasserstoffperoxid-Gehalts durch weitere Nebenreaktionen ein. Die beobachteten Abbaureaktionen führten zu einer nichtlinearen Konzentrationsabhängigkeit des Wasserstoffperoxid-Restgehaltes. Da das Ziel

Tabelle 1

**Abbau von Wasserstoffperoxid in Roh- und UHT-Milch bei 4°C**

Wasserstoff- peroxid Anfangs- konzentration	Wiederfindung in Rohmilch				Wiederfindung in UHT-Milch			
	2 h nach Zusatz		2 d nach Zusatz		2 h nach Zusatz		2 d nach Zusatz	
mg/l	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
32	nn	0,0	nn	0,0	30,2	94,4	4,0	12,5
64	nn	0,0	nn	0,0	61,4	95,9	9,3	14,5
100	4,0	4,0	nn	0,0	–	–	–	–
150	25,7	17,1	nn	0,0	–	–	–	–
200	39,9	20,0	nn	0,0	–	–	–	–
500	–	–	6,7	1,3	–	–	–	–

nn=nicht nachweisbar

– =nicht geprüft

der Arbeit jedoch nicht eine Beschreibung der Abbaukinetik war, wurde nur eine Messung nach zweitägiger Lagerung durchgeführt. In Rohmilch hingegen verläuft der Abbau sehr rasch, so dass eine hohe Anfangskonzentration erforderlich ist, um einen konservierenden Effekt zu erzielen, insbesondere ohne Rhodanid-Zusatz. Mikrobiell gebildetes Wasserstoffperoxid liegt im Bereich unterhalb der Nachweisgrenze der Bestimmungsmethode.

**Zusammenfassung**

Der OxyStat-Test eignet sich zur raschen Quantifizierung von Wasserstoffperoxid in Milch nach vorgängiger Carrez-Fällung im Messbereich von 3–40 mg/l. Proben mit höherer Konzentration sind zu verdünnen. Dank dem Mikrotiterplatten-Format lassen sich mit dieser einfachen photometrischen Methode grosse Probenreihen screenen. Durch die Möglichkeit der Quantifizierung kann die Relevanz einer festgestellten Kontamination sofort beurteilt werden. Rückstände in UHT-Milch lassen auf wasserstoffperoxidhaltige Reinigungs- und Desinfektionsmittel schliessen. Werden hingegen in Rohmilch selbst geringe Rückstände festgestellt, ist anzunehmen, dass aufgrund der hohen Abbaurate Wasserstoffperoxid in hoher Konzentration zum Zwecke der Haltbarmachung appliziert wurde.

**Résumé**

Le test OxyStat s'est révélé approprié au dosage de routine du peroxyde d'hydrogène dans le lait entre 3 et 40 mg/l après une précipitation selon Carrez. Les échantillons montrant une concentration plus élevée sont dilués avant l'analyse. L'utilisation d'une plaque de microtitration permet l'examen de grandes séries d'échantillons à l'aide de cette méthode simple à détection photométrique. L'évaluation de la teneur du peroxyde d'hydrogène permet de juger immédiatement l'importance de la contamination d'un échantillon positif. La présence de résidus dans le

lait chauffé à ultra-haute température est à mettre en rapport avec une contamination par des agents de nettoyage et de désinfection. Par contre, la détection de peroxyde d'hydrogène dans le lait cru révèle une très probable adjonction de celui-ci dans un but de conservation, et ceci même s'il s'agit de traces, car la dégradation du peroxyde d'oxygène conduit à un niveau de résidu minime.

### Summary "Microtiterplate Assay for the Quantitative Determination of Hydrogen Peroxide in Milk"

The OxyStat test kit has been proven suitable for the quantitation of hydrogen peroxide in milk after precipitation with Carrez reagents in the range of 3 to 40 mg/l. Samples showing higher concentrations are diluted before testing. Using a microtiter plate large sample series can be screened using this simple photometric test method. Based on the quantitative test results the initial level of contamination of a positive sample may be assessed. Residues in UHT milk may be due to a contamination by cleaning and disinfection solutions. In consequence of the rapid decomposition in raw milk, any presence of hydrogen peroxide must be related to an intentional use for the purpose of milk conservation.

#### Key words

Milk, Quantitative enzymatic test, Microtiter plate, Hydrogen peroxide, Preservatives

#### Literatur

- 1 Walser, P.E.: Using conventional microtiter plate technology for the automation of microbiological testing of drinking water. *J. Rapid Methods Automation Microbiol.* **8**, 193–207 (2000).
- 2 Subren, G. and Luitz, M.: Evaluation of microbial inhibitor tests with indicator in microtiter plates by photometric measurements. *Milchwissenschaft* **50**, 467–470 (1995).
- 3 Lönnerdal, B., Woodhouse, L.R. and Glazier, C.: Compartmentalization and quantitation of protein in human milk. *J. Nutr.* **117**, 1385–1395 (1987).
- 4 Anonym: Schweizerisches Lebensmittelbuch Kapitel Milch 1/4.2. Eidgenössische Druck-sachen- und Materialzentrale, Bern 1995.
- 5 Bosset, J.O., Bütikofer, U., Eberhard, P., Nick, B. und Walser, P.E.: Ringversuch «Qualitativer Nachweis der Lactoperoxidase in Milch». *Mitt. Lebensm. Hyg.* **90**, 282–290 (1999).
- 6 Ridascreen® CIS, R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Deutschland
- 7 RC-Kits, Z.E.U.-Inmunotec S.L., Zaragoza, Spanien
- 8 Santha, I.M. and Ganguli, N.C.: Myriad uses of hydrogen peroxide in dairy industry. *J. Food Sci. Technol.* **13**, 1–5 (1976).
- 9 Codex-Norm CAC/GL 13-1991, FAO, Roma.
- 10 Barrett, N.E., Grandison, A.S. and Lewis, M.J.: Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. *J. Dairy Res.* **66**, 73–80 (1999).
- 11 Rossi, E.A., Oliveira, J.S. and Faria, J.B.: Effect of hydrogen peroxide levels on the effectiveness of lactoperoxidase system in raw milk. *Ciencia Technol. Alimentos* **14**, 178–188 (1995).
- 12 Juven, B.J. and Pierson, M.D.: Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *J. Food Protection* **59**, 1233–1241 (1996).



- 13 Asai, Y., Kuwahira, H., Shimoda, K. and Sato, K.: Rapid microanalysis of residual hydrogen peroxide in foods by use of ammonium thiocyanate. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **23**, 438–443 (1982).
- 14 Ferrier, L.K., Olson, N.F. and Richardson, T.: Analysis of hydrogen peroxide in milk using titanium tetrachloride. *J. Dairy Sci.* **53**, 598–599 (1970).
- 15 Gilliland, S.E.: Enzymatic determination for residual hydrogen peroxide. *J. Dairy Sci.* **52**, 321–324 (1969).
- 16 Barone, W.B. and Krett, O.J.: Rapid procedure for the detection of hydrogen peroxide-catalase treated milk. *J. Dairy Sci.* **52**, 882 (1969).
- 17 Perid® Test, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
- 18 OxyStat, Biomedica GmbH, Wien, Oesterreich

Korrespondenzadresse: Paul E. Walser, Chemisches Laboratorium des Kantons Graubünden, Planaterrastrasse 11, CH-7000 Chur, E-mail: paul.walser@klgr.gr.ch