

	Lebensmittel Mikrobiologische Bestimmung von Folat Deutsche Fassung EN 14131:2003	DIN EN 14131
--	---	--

ICS 07.100.30

Foodstuffs — Determination of folate by microbiological assay;
German version EN 14131:2003

Produits alimentaires — Détermination des folates par essai microbiologique;
Version allemande EN 14131:2003

Die Europäische Norm EN 14131:2003 hat den Status einer Deutschen Norm.

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm ist vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN) erarbeitet worden.

Die Mitarbeit des DIN wird über den Arbeitsausschuss „Vitamine“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

Für die im Abschnitt 2 zitierte Norm wird im Folgenden auf die entsprechende Deutsche Norm hingewiesen:

EN ISO 3696 siehe DIN ISO 3696

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen; Identisch mit ISO 3696:1987.*

Fortsetzung 19 Seiten EN

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

— Leerseite —

Deutsche Fassung

Lebensmittel
Mikrobiologische Bestimmung von Folat

Foodstuffs —
Determination of folate by microbiological assay

Produits alimentaires —
Détermination des folates par essai microbiologique

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 21. April 2003 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, der Slowakei, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn und dem Vereinigten Königreich.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B-1050 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	2
1 Anwendungsbereich	3
2 Normative Verweisungen	3
3 Kurzbeschreibung	3
4 Chemikalien	3
5 Geräte	7
6 Durchführung	8
7 Auswertung	12
8 Präzision	13
9 Untersuchungsbericht	14
Anhang A (informativ) Wahlweise Behandlung mit Enzymen	15
Anhang B (informativ) Ergebnisse von Ringversuchen	18
Literaturhinweise	19

Vorwort

Dieses Dokument (EN 14131:2003) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Dezember 2003, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Dezember 2003 zurückgezogen werden.

Die Anhänge A und B sind informativ.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Slowakei, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn und Vereinigtes Königreich.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an Folat in Lebensmitteln fest, wobei das Wachstums des Mikroorganismus *Lactobacillus casei*, subsp. *rhamnosus* (ATCC 7469) durch Trübungsmessung bestimmt wird.

Dieses Verfahren erlaubt die Bestimmung von Folat einschließlich natürlich vorkommender Folate und hinzugefügter Folsäure (Pteroylglutaminsäure) in Lebensmitteln.

2 Normative Verweisungen

Diese Europäische 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 Europäischen Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung dieser Publikationen eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation (einschließlich Änderungen).

EN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen (ISO 3696:1987)*.

3 Kurzbeschreibung

Die Proben werden in Phosphatpuffer suspendiert und zur Extraktion des Folats erhitzt. Zum weitergehenden Aufschluss der Lebensmittelmatrix darf mit Protease und α -Amylase behandelt werden. Natürlich vorkommende Folylpolyglutamate werden mit γ -Glutamylhydrolase (EC 3.4.19.9) [1] zu Folylmono- oder Folyldi-glutamaten hydrolysiert.

Die extrahierten Folate werden mit der Grundlösung, die alle zum Wachstum notwendigen Nährstoffe mit Ausnahme von Folat enthält, verdünnt. Das Wachstum von *Lactobacillus casei*, subsp. *rhamnosus* (ATCC 7469) in Abhängigkeit von den extrahierten Folaten wird turbidimetrisch verfolgt und mit Kalibrierlösungen bekannter Konzentration verglichen.

Ein halbautomatisches System zur Behandlung von Flüssigkeiten und eine Mikrotiterplatte oder Reagenzgläser für die Bebrütung der Mikroorganismen können ebenso verwendet werden.

4 Chemikalien

4.1 Allgemeines

Falls nicht anders angegeben, werden bei der Analyse nur analysenreine Chemikalien und Wasser von mindestens Qualität 1 nach EN ISO 3696 verwendet. Das Wasser für die Herstellung der Reagenzien muss in einer Glasapparatur destilliert worden sein.

4.2 Reagenzien und Lösungen

4.2.1 Glycerin, $w(\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3) = 80 \%$

120 ml Glycerin werden mit 30 ml glas-destilliertem Wasser gemischt.

4.2.2 1-Octanol, $C_8H_{18}O$

4.2.3 Toluol, C_7H_8

4.2.4 2-Mercaptoethanol, $c(C_2H_6OS) = 0,1 \text{ mol/l}$

70 μl 2-Mercaptoethanol werden mit 10 ml Wasser verdünnt.

4.2.5 Natriumascorbat, $C_6H_7O_6Na$

In dieser Norm wird die Verwendung verschiedener Natriumascorbat-Lösungen beschrieben. Es darf auch Ascorbinsäure verwendet werden. Die Einstellung des pH-Wertes muss dann entsprechend modifiziert werden.

4.2.6 Salzsäure, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$

4.2.7 Natriumhydroxidlösung, $w(\text{NaOH}) = 40 \%$

400 g Natriumhydroxid werden in Wasser aufgelöst und auf 1 l aufgefüllt.

4.2.8 Ammoniumsulfat, $H_8N_2O_4S$

4.2.9 Natriumdihydrogenphosphat, wasserfrei, NaH_2PO_4

Die Menge an benötigtem Natriumdihydrogenphosphat zur Herstellung des Puffers (4.3) wurde für die wasserfreie Substanz berechnet. Die Mono- oder Dihydrate dürfen bei entsprechender Anpassung des Verfahrens auch verwendet werden.

4.2.10 2-(N-Cyclohexylamino)ethansulfonsäure (CHES), $C_8H_{17}NO_3S$

4.2.11 N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES), $C_8H_{18}N_2O_4S$

4.2.12 Aktivkohlepulver, säuregewaschen

4.2.13 Kochsalzlösung, steril

9 g Natriumchlorid werden in 1 000 ml Wasser gelöst. 10-ml-Anteile werden in 20 mm $\times$ 150 mm Reagenzgläser verteilt. Die Reagenzgläser werden mit einem Deckel verschlossen und 15 min bei 121 °C erhitzt. Anschließend werden sie gekühlt und in gekühltem Zustand gelagert.

4.2.14 Folsäurefreie Grundnährlösung, doppelt konzentriert

Für jede der benötigten 100 ml wird die empfohlene Menge Grundnährsubstrat (Bacto Folic Acid Casei Medium oder Entsprechendes)¹⁾ in 100 ml glas-destilliertem Wasser suspendiert. 0,050 g Natriumascorbat (4.2.5) werden hinzugefügt, und die Lösung wird 1 min bis 2 min gekocht. Nach dem Kühlen auf Raumtemperatur wird der pH-Wert auf $6,1 \pm 0,1$ eingestellt.

1) Bacto Folic Acid Casei Medium ist der Markenname eines von Difco vertriebenen Produkts. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

4.2.15 Folsäure-Standardsubstanz

Die Folsäure kann von verschiedenen Lieferanten bezogen werden und darf bis zu 8 % Wasser enthalten. Die Reinheit der Folsäure-Standards darf schwanken, und es ist folglich notwendig, die Konzentration der Kalibrierlösung durch Absorptionsmessung im UV-Bereich zu bestimmen (siehe Überprüfung der Konzentration in 6.4.2).

4.3 Pufferlösungen

4.3.1 Phosphatpuffer, pH 5,0 ($c = 0,002 \text{ mol/l}$)

0,24 g Natriumdihydrogenphosphat (4.2.9) werden in 900 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid (4.2.7) auf $5,0 \pm 0,1$ eingestellt, und die Lösung wird mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt.

4.3.2 Phosphatpuffer, pH 7,0 ($c = 0,1 \text{ mol/l}$)

12,0 g Natriumdihydrogenphosphat (4.2.9) werden in 900 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid (4.2.7) auf $7,0 \pm 0,1$ eingestellt, und die Lösung wird mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt.

4.3.3 Phosphatpuffer, pH 5,0 ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) mit 2-Mercaptoethanol ($c = 10 \text{ mmol/l}$)

12,0 g Natriumdihydrogenphosphat (4.2.9) werden in 900 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird auf $5,0 \pm 0,1$ eingestellt, 0,70 ml 2-Mercaptoethanol (4.2.4) werden hinzugefügt, und die Lösung wird mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt.

4.3.4 Phosphatpuffer, pH 4,5 ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) mit Ascorbat (1 %)

12,0 g Natriumdihydrogenphosphat (4.2.9) und 10 g Natriumascorbat (4.2.5) werden in 900 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid (4.2.7) auf $4,5 \pm 0,1$ eingestellt, und die Lösung wird mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird am Verwendungstag frisch hergestellt.

4.3.5 Phosphatpuffer, pH 6,1 ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) mit Ascorbat (1 %)

12,0 g Natriumdihydrogenphosphat (4.2.9) und 10 g Natriumascorbat (4.2.5) werden in 900 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid (4.2.7) auf $6,1 \pm 0,1$ eingestellt, und die Lösung wird mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird am Verwendungstag frisch hergestellt.

4.3.6 Phosphatpuffer, pH 7,8 ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) mit Ascorbat (1 %)

12,0 g Natriumdihydrogenphosphat (4.2.9) und 10 g Natriumascorbat (4.2.5) werden in 900 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid (4.2.7) auf $7,8 \pm 0,1$ eingestellt, und die Lösung wird mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird am Verwendungstag frisch hergestellt.

4.3.7 CHES/HEPES-Puffer, pH 7,85 ($c = 0,05 \text{ mol/l}$) mit Ascorbat und 2-Mercaptoethanol (4.2.4) für die Dialyse von Rattenblutplasma.

23,8 g HEPES (4.2.11), 20,7 g CHES (4.2.10), 40 g Natriumascorbat (4.2.5) und 1,4 ml 2-Mercaptoethanol (4.2.4) werden in 1 900 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid (4.2.7) auf $7,85 \pm 0,1$ eingestellt, und die Lösung wird mit Wasser auf 2 000 ml aufgefüllt. 4 g säuregewaschenes Aktivkohlepulver (4.2.12) werden hinzugefügt. Die Lösung wird am Verwendungstag frisch hergestellt.