

DIN EN ISO 22160

ICS 67.100.01

**Milch und flüssige Milcherzeugnisse –
Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase –
Verfahren mit einem enzymatisch photoaktivierten System (EPAS)
(ISO 22160:2007);
Deutsche Fassung EN ISO 22160:2007**

Milk and milk-based drinks –
Determination of alkaline phosphatase activity –
Enzymatic photo-activated system (EPAS) method (ISO 22160:2007);
German version EN ISO 22160:2007

Lait et boissons à base de lait –
Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline –
Méthode par un système de photoactivation enzymatique (ISO 22160:2007);
Version allemande EN ISO 22160:2007

Gesamtumfang 23 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 22160:2007) fällt in den Zuständigkeitsbereich des Technischen Komitees CEN/TC 302 „Milch und Milchprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ (Sekretariat: NEN [Niederlande]). Die ihr zugrunde liegende Internationale Norm ISO 22160:2007 wurde vom Unterkomitee SC 5 „Agricultural food products“ (Sekretariat: NEN [Niederlande]) des Technischen Komitees ISO/TC 34 „Milk and milk products“ (Sekretariat: MSZT [Ungarn]) ausgearbeitet.

Aufgrund der Ergebnisse des parallelen Abstimmungsverfahrens wurde ISO 22160:2007 als Europäische Norm EN ISO 22160 übernommen.

Die Mitarbeit des DIN beim Europäischen Komitee für Normung (CEN) wird für das CEN/TC 302 „Milch und Milchprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ (Sekretariat: NEN [Niederlande]) über den DIN-Arbeitsausschuss „Milch und Milchprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 707	siehe DIN EN ISO 707
ISO 5725-1	siehe DIN ISO 5725-1
ISO 5725-2	siehe DIN ISO 5725-2
ISO 11816-1	siehe DIN EN ISO 11816-1
ISO 11816-2	siehe DIN EN ISO 11816-2

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 707, *Milch und Milchprodukte — Leitfaden zur Probenahme*

DIN ISO 5725-1, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

DIN EN ISO 11816-1, *Milch und Milchprodukte — Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase — Teil 1: Fluorimetrisches Verfahren für Milch und flüssige Milchprodukte*

DIN EN ISO 11816-2, *Milch und Milchprodukte — Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase — Teil 2: Fluorimetrisches Verfahren für Käse*

Deutsche Fassung

**Milch und flüssige Milcherzeugnisse —
Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase —
Verfahren mit einem enzymatisch photoaktivierten
System (EPAS)
(ISO 22160:2007)**

Milk and milk-based drinks —
Determination of alkaline phosphatase activity —
Enzymatic photo-activated system (EPAS) method
(ISO 22160:2007)

Lait et boissons à base de lait —
Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline —
Méthode par un système de photoactivation enzymatique
(ISO 22160:2007)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 6. März 2007 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 des CEN 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, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

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

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Begriffe	4
3 Kurzbeschreibung	4
4 Reagenzien	4
5 Geräte	6
6 Probenahme	7
7 Vorbereitungen	7
7.1 Untersuchungsproben	7
7.2 Milch, frei von alkalischer Phosphatase	7
8 Durchführung	8
8.1 Kalibrierung	8
8.2 Kalibriereinstellung	9
8.3 Kontrollprüfungen und Kalibrierkontrolle	13
8.4 Bestimmung	14
8.5 Kontrolle auf hitzebeständige mikrobielle alkalische Phosphatase	14
9 Auswertung und Angabe der Ergebnisse	15
9.1 Allgemeines	15
9.2 Manuelle Berechnung	15
9.3 Angabe der Untersuchungsergebnisse	15
10 Präzision	15
10.1 Ringversuch	15
10.2 Wiederholpräzision	16
10.3 Vergleichpräzision	16
11 Untersuchungsbericht	16
Anhang A (informativ) Ablaufplan des Verfahrens	17
Anhang B (informativ) Ergebnisse der Ringversuche	18
Literaturhinweise	21

Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 22160:2007) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Agricultural food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 302 „Milch- und Milchprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Oktober 2007, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2007 zurückgezogen werden.

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

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 22160:2007 wurde vom CEN als EN ISO 22160:2007 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Verfahren für die Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase in pasteurisierter Vollmilch, Halbfettmilch, Magermilch, Sahne und aromatisierten Milcherzeugnissen mit einem chemilumineszenten (EPAS)-Verfahren fest.

Das Verfahren ist für Milch und flüssige Milcherzeugnisse von Kühen, Schafen, Büffeln und Ziegen anwendbar.

Dieses Verfahren ist auch auf Flüssigproben anwendbar, die so verdünnt werden, dass die Aktivität der alkalischen Phosphatase weniger als 7 000 Milliunits je Liter (mU/l) beträgt.

ANMERKUNG Ein erfolgreicher Ringversuch fand statt, sowohl mit Vollmilch von Kühen, Schafen, Büffeln und Ziegen als auch mit Magermilch von Kühen (Fettgehalt < 0,5 %), Sahne mit 20 % Fettgehalt und Schokoladenmilch mit 2 % Fettgehalt (jeweils Massenanteil).

2 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

2.1

Aktivität der alkalischen Phosphatase

ALP

Aktivität der alkalischen Phosphatase, die nach dem in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahren in einem Produkt bestimmt wird

ANMERKUNG Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wird in Milliunits Enzymaktivität je Liter (mU/l) angegeben [4], [5].

2.2

Einheit der alkalischen Phosphatase

Menge des Enzyms alkalischer Phosphatase, die die Umsetzung von 1 µmol stabilem aromatischem Substrat je Minute katalysiert

3 Kurzbeschreibung

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wird durch die instrumentelle Messung der Photoaktivierung eines hydrolysierten Produktes bestimmt. Bei Anwesenheit alkalischer Phosphatase wird bei $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ein stabiles Dioxetan-Phosphatsubstrat hydrolysiert, welches ein photoaktiviertes (chemilumineszentes) Produkt bildet. Die Photoaktivierung des Produktes wird durch eine makromolekulare Steigerungskomponente verstärkt. Die Hydrolyse wird nach einer festgelegten Inkubationszeit (3 min) beendet. Der so gebildete Betrag an chemilumineszentem Produkt wird mit einem Luminometer bestimmt und der Gehalt in Enzymeinheiten angegeben. Die Kalibrierung des Luminometers erfolgt mit Tabletten bekannter Enzymaktivität.

4 Reagenzien

Falls nicht anders festgelegt, sind nur analysenreine Chemikalien und destilliertes oder entmineralisiertes Wasser oder Wasser gleichwertiger Reinheit zu verwenden.

4.1 Nicht chemilumineszentes Dioxetanester-Substrat [0,2 mol/l 3-(2'-Spiroadamantan)-4-methoxy-4-(-3"-phosphat-phenyl-1,2-dioxetan Dinatriumsalz in DEAE-Puffer mit 1 % Fluorosin] ist im Handel erhältlich (z. B. als Charm-Reagenz AP^{®1)} liquid).

Vorzugsweise wird das Substrat bei zwischen 0 °C und 7 °C gelagert. Bei Lagerung in braunen Kunststoffflaschen bei 4 °C bleibt das Substrat für sechs Monate stabil. Bei Lagerung bei 30 °C ist das Substrat nur für 24 h haltbar.

Wenn das Substrat in der Messung verwendet wird, wird es bei zwischen 0 °C und 7 °C oder auf Eis gelagert.

4.2 Stopplösung

Die Stopplösung wird durch Mischung von gleichen Mengen von 0,15 mol/l von 2-Amino-2-methyl-1-propanol und 0,02 % Benzalkoniumchlorid pH = 10,7 hergestellt. Die Stopplösung muss vor der Verwendung Raumtemperatur (18 °C bis 24 °C) erreichen. Zur Einheitlichkeit der Messung ist eine Temperaturdifferenz von maximal 0,5 °C gegenüber der Lösungstemperatur bei der Kalibrierung zu erfassen und beizubehalten, falls nicht ein Temperaturfühler verwendet wird.

ANMERKUNG Die Stopplösung wird zum Abbruch der enzymatischen Hydrolyse des nicht chemilumineszenten Dioxetanestersubstrates (4.1) verwendet.

Handelsübliche Stopplösung weist eine Haltbarkeit von einem Jahr bei Lagerung bei 4 °C oder von zwei Monaten bei Lagerung bei Raumtemperatur auf. Bei der täglichen Verwendung wird die Lagerung bei Raumtemperatur empfohlen.

4.3 Kalibriersubstanzen, z. B. Kalibriertabletten (getrocknete Rohmilch in Tablettenform mit einem bekannten Phosphatasegehalt zur Rehydratisierung in Milch) mit einer Phosphataseaktivität von 875 µU/l ± 26 µU/l. Die Tabletten werden mit drei verschiedenen Volumina flüssiger Milcherzeugnisse ohne Phosphataseaktivität oder der Negativuntersuchungsprobe (7.2) rehydratisiert, um die Standardkalibriergerade zu erstellen.

Handelsübliche Kalibriertabletten dürfen bei 4 °C zwei Jahre gelagert werden.

4.3.1 Kalibriersubstanzen für flüssige weiße Milch

In jeweils einem von drei 50-ml-Probenröhrchen (5.9), die als A₁, B₁ und C₁ gekennzeichnet sind, wird eine Kalibriertablette in 100 µl destilliertem Wasser gelöst.

Es werden zu Röhrchen A₁ 20 ml, zu Röhrchen B₁ 5 ml und zu Röhrchen C₁ 2,5 ml des flüssigen weißen Milcherzeugnisses (ohne Phosphataseaktivität) oder der Negativuntersuchungsprobe (7.2) zugegeben, um die Kalibrierstandards A₁, B₁ und C₁ mit folgenden Phosphataseaktivitäten herzustellen: A₁ = 44 mU/l, B₁ = 175 mU/l und C₁ = 350 mU/l. Die Röhrchen werden verschlossen, und der Inhalt wird gründlich gemischt. Der Inhalt der Röhrchen rehydratisiert gekühlt für 10 min. Vor der Verwendung wird gut gemischt.

4.3.2 Kalibriersubstanzen für Sahne und aromatisierte Milch

In jeweils einem von drei 50-ml-Probenröhrchen (5.9), die als A₂, B₂ und C₂ gekennzeichnet sind, wird eine Kalibriertablette in 100 µl destilliertem Wasser gelöst.

1) Die in Abschnitt 4 festgelegten Reagenzien und die in 5.1 festgelegten Geräte sind erhältlich von Charm Sciences Inc., 659 Andover St., Lawrence, MA 01843, USA. Es handelt sich um Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieser Produkte durch ISO oder IDF. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu gleichen Ergebnissen führen