

DIN EN ISO 14501



ICS 67.100.10

Entwurf

Einsprüche bis 2020-01-22
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 14501:2008-01

**Milch und Milchpulver –
Bestimmung des Gehalts an Aflatoxin M1 –
Reinigung durch Immunaффinitäts-Chromatographie und Bestimmung mit
Hochleistungs-Flüssigchromatographie (ISO/DIS 14501:2019);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 14501:2019**

Milk and milk powder –
Determination of aflatoxin M1 content –
Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid
chromatography (ISO/DIS 14501:2019);
German and English version prEN ISO 14501:2019

Lait et lait en poudre –
Détermination de la teneur en aflatoxine M1 –
Purification par chromatographie d'immunoaffinité et détermination par chromatographie en
phase liquide à haute performance (ISO/DIS 14501:2019);
Version allemande et anglaise prEN ISO 14501:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-11-22 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-
Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de,
sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im
Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-
Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL),
10772 Berlin, Saatwinkler Damm 42/43, 13627 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 37 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 14501:2019) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 302 „Milch und Milcherzeugnisse — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-05-13 AA „Milch und Milcherzeugnisse — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 707	siehe	DIN EN ISO 707
ISO 5725-1:1994	siehe	DIN ISO 5725-1:1997-11
ISO 5725-2:1994	siehe	DIN ISO 5725-2:2002-12

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 14501:2008-11 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Anwendungsbereich überarbeitet;
- b) Begriff Aflatoxin-M1-Gehalt überarbeitet;
- c) Anhang B hinzugefügt;
- d) Literaturhinweise aktualisiert;
- e) Norm redaktionell überarbeitet.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN ISO 5725-1:1997-11, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe (ISO 5725-1:1994)*

DIN ISO 5725-2:2002-12, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens (ISO 5725-2:1994 einschließlich Technisches Korrigendum 1:2002)*

— Leerseite —

**Milch und Milchpulver — Bestimmung des Gehalts an Aflatoxin M1 —
Reinigung durch Immunaффinitäts-Chromatographie und Bestimmung mit
Hochleistungs-Flüssigchromatographie (ISO/DIS 14501:2019)**

Lait et lait en poudre — Détermination de la teneur en aflatoxine M1 — Purification par chromatographie d'immunoaffinité et détermination par chromatographie en phase liquide à haute performance (ISO/DIS 14501:2019)

Milk and milk powder — Determination of aflatoxin M1 content — Clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography (ISO/DIS 14501:2019)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort.....	3
Vorwort.....	4
1 Anwendungsbereich.....	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung.....	7
5 Chemikalien	7
6 Prüfeinrichtung	9
7 Probenahme.....	10
8 Durchführung	10
8.1 Vorbereitung der Untersuchungsproben	10
8.1.1 Milch	10
8.1.2 Milchpulver	10
8.2 Vorbereitung der Immunaффinitätssäule.....	11
8.3 Reinigung der Untersuchungsproben	11
8.4 Hochleistungs-Flüssigchromatographie.....	11
8.4.1 Einstellung der Pumpe	11
8.4.2 Leistungsfähigkeit der Chromatographie	12
8.4.3 Kalibrierkurve von Aflatoxin M ₁	12
8.4.4 Untersuchung der gereinigten Extrakte und Injektionsschema.....	12
9 Auswertung und Angabe der Ergebnisse.....	12
9.1 Magermilch.....	12
9.1.1 Berechnung	12
9.1.2 Angabe der Ergebnisse	13
9.2 Magermilchpulver.....	13
9.2.1 Berechnung	13
9.2.2 Angabe der Ergebnisse	13
10 Präzision	13
10.1 Ringversuch	13
10.2 Wiederholpräzision.....	13
10.3 Vergleichpräzision.....	14
11 Untersuchungsbericht	14
Anhang A (normativ) Ringversuchsergebnisse	15
Anhang B (informativ) Beispiel eines Emissionsspektrums von Aflatoxin M ₁	16
Literaturhinweise.....	17

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 14501:2019) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 302 „Milch und Milcherzeugnisse — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 14501:2007 ersetzen.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 14501:2019 wurde von CEN als prEN ISO 14501:2019 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Themen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 5, *Milk and milk products*, in Zusammenarbeit mit der International Dairy Federation (IDF) erarbeitet. Es wird von ISO und IDF gemeinsam veröffentlicht.

Bei der **IDF (International Dairy Federation)** handelt es sich um eine private, gemeinnützige Organisation, welche auf globaler Ebene die Interessen verschiedener Stakeholder der Milchwirtschaft vertritt. Die Mitglieder der IDF sind in nationalen Komitees organisiert, die als landesweite Vereinigungen aus Interessenvertretern der nationalen Milchwirtschaft bestehen. Hierzu zählen unter anderem Molkereibetriebe, die milchverarbeitende Industrie, Lieferanten von Molkereiprodukten, Wissenschaftler und Regierungsstellen sowie Lebensmittelbehörden.

ISO und IDF arbeiten in allen Belangen der Normung von Probenahme- und Analyseverfahren bei Milch und Milcherzeugnissen eng zusammen. Seit 2001 veröffentlichen ISO und IDF gemeinsam ihre Internationalen Normen. Dabei verwenden sie die Logos und Verweisnummern beider Organisationen.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. IDF ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Dieses Dokument wurde von dem IDF *Standing Committee on Analytical Methods for Composition* und vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 5, *Milk and milk products*, erarbeitet. Es wird von ISO und IDF gemeinsam veröffentlicht.

Die Arbeiten wurden vom IDF/ISO Action Team A12 des *Standing Committee on Analytical Methods for Composition* unter Federführung seines Projektleiters, Herrn Paul Jamieson durchgeführt.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren zur Bestimmung des Aflatoxin-M₁-Gehalts von Milch und Milchpulver fest. Der kleinste Validierungswert beträgt 0,08 µg/kg für Vollmilchpulver, d. h. 0,008 µg/l für rekonstituierte Milch. Die Nachweisgrenze (LOD, en: limit of detection) beträgt 0,05 µg/kg für Milchpulver sowie 0,005 µg/kg für Milch. Die Quantifizierungsgrenze (LOQ, en: limit of quantification) beträgt 0,1 µg/kg für Milchpulver sowie 0,01 µg/kg für Milch.

Das Verfahren ist auch auf fettarme Milch, Magermilch, fettarmes Milchpulver und Magermilchpulver anwendbar.

WARNUNG 1 — Bei dem in diesem Dokument beschriebenen Verfahren müssen Lösungen von Aflatoxin M₁ verwendet werden. Aflatoxine sind für den Menschen karzinogen. Zu beachten sind die Feststellungen der International Agency for Research on Cancer (WHO) [1] [2].

WARNUNG 2 — Das die Untersuchungen durchführende Laboratorium ist ausreichend vor Tageslicht zu schützen, und die Aflatoxin-Standardlösungen sind gegen Licht zu schützen, z. B. mithilfe von Aluminiumfolie.

WARNUNG 3 — Die Verwendung von Glasgeräten (z. B. Röhrchen, Flaschen, Kolben, Bechergläsern, Spritzen), die nicht mit Säure gewaschen worden sind, kann Verluste an Aflatoxin verursachen. Deshalb sollten neue Laborgeräte aus Glas, die mit wässrigen Aflatoxinlösungen in Berührung kommen, für einige Stunden in verdünnter Säure (z. B. Schwefelsäure, $c = 2 \text{ mol/l}$) gelagert und danach zur Beseitigung aller Säurespuren gut mit destilliertem Wasser gespült werden. Es ist sicherzustellen, dass der pH-Wert zwischen 6 und 8 liegt.

WARNUNG 4 — Laboratoriumsabfälle wie feste chemische Stoffe, Lösungen in organischen Lösemitteln, wässrige Lösungen und vergossene Flüssigkeiten sowie Glasgeräte, die in Kontakt mit karzinogenen Materialien kommen, sind einer Dekontamination zu unterziehen. Geeignete Verfahren zur Dekontamination wurden von der International Agency for Research on Cancer entwickelt und validiert (WHO) [1] [2].

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

3.1

Aflatoxin-M₁-Gehalt

Konzentration (in µg/l) oder Massenanteil (in µg/kg) der Substanzen, die nach dem in diesem Dokument festgelegten Verfahren bestimmt werden

4 Kurzbeschreibung

Die Extraktion des Aflatoxins M₁ erfolgt, indem eine Untersuchungsprobe durch eine Immunaффinitätssäule gegeben wird. Die Säule enthält spezifische, an einen festen Träger gebundene Antikörper.

Wenn die Probe die Säule durchläuft, binden die Antikörper selektiv alles Aflatoxin-M₁-Antigen und bilden einen Antikörper-Antigen-Komplex. Alle anderen Bestandteile der Probenmatrix werden mit Wasser von der Säule gewaschen. Das Aflatoxin M₁ wird aus der Säule eluiert und das Eluat gesammelt. Der Gehalt des in diesem Eluat vorhandenen Aflatoxins M₁ wird durch Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC, en: high-performance liquid chromatography) in Verbindung mit einer fluorometrischen Detektion bestimmt.

5 Chemikalien

Sofern nicht anders festgelegt, sind während der Analyse nur analysenreine Chemikalien und destilliertes oder entmineralisiertes Wasser oder Wasser vergleichbarer Reinheit zu verwenden.

5.1 Immunaффinitätssäule

Die Immunaффinitätssäule muss Antikörper gegen Aflatoxin M₁ enthalten. Die maximale Kapazität der Säule darf nicht geringer als 100 ng Aflatoxin M₁ sein (dies entspricht einer Massenkonzentration von 2 µg/l bei einem verwendeten Probenvolumen von 50 ml). Bei Anwendung einer 4 ng des Toxins enthaltenden Standardlösung darf die Wiederfindungsrate für Aflatoxin M₁ nicht geringer als 80 % sein (dies entspricht einer Massenkonzentration von 80 ng/l bei einem verwendeten Probenvolumen von 50 ml). Jede die oben angegebenen Leistungskriterien erfüllende Immunaффinitätssäule darf verwendet werden.¹

Die Leistung der Säulen muss regelmäßig und mindestens einmal für jede Charge der Säulen überprüft werden (siehe Ablauf in 5.1.1 und 5.1.2).

5.1.1 Kapazitätsüberprüfung

2,0 ml Aflatoxin-M₁-Standardstammlösung (5.4.2) werden auf 50 ml mit Wasser verdünnt. Nach gutem Durchmischen wird das gesamte Volumen auf die Immunaффinitätssäule gegeben. Die Empfehlungen des Herstellers für den Gebrauch der Säulen sind sorgfältig zu beachten. Nach Auswaschen der Säule wird das Toxin eluiert. Nach geeigneter Verdünnung des Eluats wird die von der Säule eluierte Menge an Aflatoxin M₁ mittels HPLC bestimmt.

Die Wiederfindung an Aflatoxin M₁ wird berechnet. Das Ergebnis wird mit den in 5.1 angegebenen Leistungsmerkmalen verglichen.

1 Beispiele für Immunaффinitätssäulen: Afla Test P (Vicam®), Aflaprep® M (R-Biopharm), vergleichbare Produkte sind auch erhältlich über Romer Labs®, Bioo Scientific® und Neogen®, diese Produkte sind Beispiele geeigneter handelsüblicher Produkte. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieser Produkte durch ISO und/oder IDF.

5.1.2 Überprüfung der Wiederfindung

0,8 ml der Aflatoxin-M₁-Standardarbeitslösung von 0,005 µg/ml (5.4.3) werden mit einer Pipette (6.4) abgenommen und mit Wasser auf 50 ml verdünnt. Nach gutem Durchmischen wird das gesamte Volumen auf die Immunaффinitätssäule gegeben. Die Empfehlungen des Herstellers für den Gebrauch der Säulen sind sorgfältig zu beachten. Nach Auswaschen der Säule wird das Toxin eluiert. Nach geeigneter Verdünnung des Eluats wird die von der Säule eluierte Menge an Aflatoxin M₁ mittels HPLC bestimmt.

Die Wiederfindung an Aflatoxin M₁ wird berechnet. Das Ergebnis wird mit den in 5.1 angegebenen Leistungsmerkmalen verglichen. Die Konzentration darf nicht weniger als 0,064 µg/l betragen. Die Überprüfungen der Wiederfindung können auch mit handelsüblichen Referenzmaterialien durchgeführt werden.

5.2 Acetonitril, rein, für die HPLC geeignet.

5.2.1 Acetonitril, 25%ige Lösung in Wasser (Volumenkonzentration).

250 ml Acetonitril (5.2) werden zu 750 ml Wasser gegeben und gemischt. Im gleichen Verhältnis dürfen auch andere Volumina eingesetzt werden. Die Lösung (Eluent) wird vor Gebrauch entgast.

5.2.2 Acetonitril, 10%ige Lösung in Wasser (Volumenkonzentration).

100 ml Acetonitril (5.2) werden zu 900 ml Wasser gegeben und gemischt. Im gleichen Verhältnis dürfen auch andere Volumina eingesetzt werden. Die Lösung (Eluent) wird vor Gebrauch entgast.

5.3 Stickstoff.

5.4 Aflatoxin-M₁-Standardlösungen

5.4.1 Aflatoxin-M₁-Standardkalibrierlösung ($\rho = 10 \mu\text{g/ml}$ Aflatoxin M₁ in Acetonitril).

Eine Aflatoxin-M₁-Standardkalibrierlösung wird durch Auflösen von Aflatoxin M₁ (C₁₇H₁₂O₇) in Acetonitril (5.2) so hergestellt, dass eine Lösung mit einer Sollkonzentration von 10 µg/ml erhalten wird. Die tatsächliche Konzentration an Aflatoxin M₁ wird durch Messung der Extinktion bei der Wellenlänge der maximalen Extinktion der Lösung, wie nachfolgend beschrieben, bestimmt.

Mit dem Spektralphotometer (6.13) wird die Extinktion der Aflatoxin-M₁-Standardkalibrierlösung gegen Acetonitril (5.2) als Blindwert bei Wellenlängen zwischen 330 nm und 370 nm aufgezeichnet. Die Extinktion A wird bei der Wellenlänge der maximalen Extinktion λ_{max} , die nahe bei 350 nm liegt, gemessen.

Die Konzentration ρ_1 , in Mikrogramm je Milliliter, wird nach Gleichung (1) berechnet:

$$\rho_1 = A \times M \times \frac{100}{d \times \varepsilon} \quad (1)$$

Dabei ist

- A der Zahlenwert der Extinktion bei λ_{max} ;
- M die molare Masse des Aflatoxins M₁, in Gramm je Mol ($M = 328 \text{ g/mol}$);
- d die optische Weglänge, in Zentimeter ($d = 1 \text{ cm}$);
- ε der Zahlenwert des molaren Extinktionskoeffizienten des Toxins in Acetonitril, in Quadratmeter je Mol ($\varepsilon = 1\,985 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$)