
**Корма для животных. Определение
афлатоксина В₁**

Animal feeding stuffs — Determination of aflatoxin B₁

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 17375:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7ab30cab-7966-408e-afaa-ed62e0219834/iso-17375-2006>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочный номер
ISO 17375:2006(R)

© ISO 2006

Отказ от ответственности при работе в PDF

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или вывести на экран, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на загрузку интегрированных шрифтов в компьютер, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 17375:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7ab30cab-7966-408e-afaa-ed62e0219834/iso-17375-2006>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2006

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO или IDF по соответствующему адресу, указанному ниже.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие	iv
1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Принцип	1
4 Реагенты	1
5 Аппаратура	4
6 Процедуры	6
6.1 Кондиционирование IAC	6
6.2 Экстракция	6
6.3 Иммуноаффинная очистка	6
6.4 Постколонная дериватизация	7
6.5 Калибровочная кривая	8
6.6 Вычисление	8
6.7 Процедуры обогащения для определения восстановления	8
7 Прецизионность	9
7.1 Межлабораторное испытание	9
7.2 Повторяемость	9
7.3 Воспроизводимость	9
8 Протокол испытаний	9
Приложение А (информативное) Результаты межлабораторного испытания	10
Библиография	11

[

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. Что касается стандартизации в области электротехники, ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC).

Проекты международных стандартов разрабатываются по правилам, указанным в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Главная задача технических комитетов состоит в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения, по меньшей мере, 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Обращается внимание на возможность патентования некоторых элементов данного международного стандарта. ISO не несет ответственности за идентификацию какого-либо или всех таких патентных прав.

Международный стандарт ISO 17375 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 10, *Корма для животных*

[ISO 17375:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7ab30cab-7966-408e-afaa-ed62e0219834/iso-17375-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7ab30cab-7966-408e-afaa-ed62e0219834/iso-17375-2006>

Корма для животных. Определение афлатоксина В₁

1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает метод для определения афлатоксина В₁ в кормах для животных методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с постколлонной дериватизации.

Он применим к животным кормам с содержанием жира вплоть до 50 %.

Было продемонстрировано, что нижний предел количественного определения этим методом афлатоксина В₁ до 0,5 мкг/кг при отношении сигнал-шум 6.

ПРИМЕЧАНИЕ Данный метод основан на методе, приведенном в Ссылке [1].

2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные нормативные документы являются обязательными при применении данного документа. Для жестких ссылок применяется только цитированное издание документа. Для плавающих ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

[ISO 17375:2006](#)

ISO 3696:1987, *Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытания*

[17375-2006](#)

3 Принцип

Испытуемый образец экстрагируют посредством раствора в растворителе (ацетон/вода). Экстракт образца фильтруют, разбавляют водой или фосфатно-солевым буферным раствором до заданной концентрации растворителя. Образец наносят на иммуноаффинную колонку (IAC), содержащую антитела, специфические для афлатоксина В₁. Афлатоксин В₁ удаляют из IAC неразбавленным этанолом и затем определяют количественно методом обратнофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) с постколлонной дериватизацией (PCD), включающей бромирование. PCD получают или посредством электрохимически образованного брома или посредством перброма бромгидрата пиридина (PBPB) с последующим флуоресцентным детектированием.

4 Реагенты

Используют только реагенты признанной аналитической чистоты, если нет других указаний.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ – Настоящий метод требует использования токсических легко воспламеняющихся жидкостей, таких как ацетон, метанол и ацетонитрил. Следует избегать контактирования с ними и держать их в отдалении от источников тепла, искр или открытого пламени.

ПРИМЕЧАНИЕ Процедуры дезинфицирования лабораторных отходов^{[2],[3]} разработаны и утверждены Международным агентством по исследованию рака (WHO).

4.1 Вода, соответствующая классу 3 по ISO 3696:1987.

4.2 Фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), pH 7,4.

PBS может быть приготовлен из хлорида калия (0,20 г), дигидрофосфата калия (0,20 г), безводного гидрофосфата динатрия (1,16 г) [или додекагидрата гидрофосфата динатрия (2,92 г)] и хлорида натрия (8,00 г), добавляемых к 900 мл очищенной воды. Регулируют pH до pH 7,4 (with 0,1 моль/л HCl or 0,1 моль/л NaOH, что соответствует) и разбавляют раствор до 1,0 л.

Альтернативно можно использовать имеющийся в продаже концентрат фосфатно-солевого буферного раствора в таблетках с аналогичными свойствами.

PBS микробиологически не устойчив, и, его следует готовить заново как минимум раз в неделю.

4.3 Пербромид бромгидрата пиридина (PBPB), CAS: 39416-48-3).

Этот реагент не требуется, когда используется электрохимически образованный бром.

4.4 Бромид калия.

Этот реагент не требуется, когда используется реагент PBPB.

4.5 Ацетонитрил класса HPLC.

4.6 Метанол класса HPLC.

4.7 Ацетон, чистый.

4.8 Вода класса HPLC, соответствующая классу 1 ISO 3696:1987.

4.9 Экстракционный растворитель, раствор ацетона (4.7) и воды (4.8) [85+15 (по объему)].

4.10 Азотная кислота, $c(\text{HNO}_3) = 4$ моль/л.

Этот реагент не требуется, когда используется реагент PBPB.

4.11 Иммуноаффинная колонка (IAC)

IAC должна содержать антитела против афлатоксина В₁. IAC должна иметь емкость, соответствующую не менее 40 нг афлатоксина В₁, и обеспечивать восстановление не менее 80 % для афлатоксина В₁ при его применении как стандартного раствора в ацетоне/воде, содержащего 0,25 нг афлатоксина В₁.

4.12 Растворитель А в качестве мобильной фазы HPLC, только для использования с постколонным реагентом PBPB.

Используют раствор воды (4.8)/ацетонитрила (4.5)/метанола (4.6) [6+2+3 (по объему)]. Отношение растворителей можно регулировать для получения оптимальных параметров разделения.

4.13 Растворитель В в качестве мобильной фазы HPLC, только для использования с электрохимически образованным бором.

Используют раствор воды (4.8)/ацетонитрила (4.5)/метанола (4.6) [6+2+3 (по объему)], содержащий 120 мг бромида кальция (4.4) и 350 мкл азотной кислоты при 4 моль/л (4.10) на литр мобильной фазы. Отношение растворителей можно регулировать для получения оптимальных параметров разделения.

Растворители в мобильной фазе (4.12 и 4.13) должны быть дегазированы.

4.14 Постколонный реагент, только для использования с постколонным реагентом PBPB.

Растворяют 25 мг PBPB (4.3) в 500 мл воды. Этот раствор можно использовать вплоть до 4 дней, если его хранить в темном месте при комнатной температуре. Этот постколонный реагент должен использоваться только в сочетании с растворителем А в качестве мобильной фазы HPLC (4.12), но не с растворителем В в качестве мобильной фазы HPLC (4.13).

ПРИМЕЧАНИЕ Постколонный реагент устойчив только в течение 3 дней.

4.15 Толуол/ацетонитрил, 98 + 2 (по объему).

4.16 Стандартный материал афлатоксин В₁, в форме кристаллов или сухой пленки для аналитических целей.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ 1 — Для этого метода требуется использование растворов афлатоксина В₁. Афлатоксины канцерогенны для человека. Обращается внимание на заявление, сделанное Международным агентством по исследованию рака (WHO) [2].

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ 2 — Афлатоксины подвержены разрушению при свете. Аналитическая работа должна быть соответствующим образом защищена от дневного света, и стандартные растворы афлатоксина следует держать защищенными от света, используя пробирки из желтого стекла или алюминиевую фольгу.

4.17 Калибровочные исходные растворы для HPLC

4.17.1 Общий исходный раствор

Приготавливают исходный раствор афлатоксина В₁ (4.16) с концентрацией 10,0 мкг/мл в толуоле/ацетонитриле (4.15).

ПРИМЕЧАНИЕ Исходный раствор в толуоле/ацетонитриле остается стабильным как минимум один год, если его хранить в стеклянной посуде, промытой кислотой, при температуре –18 °С в темноте. Если исходные растворы используются в гораздо более короткие сроки (максимум 3 месяца), тогда в качестве альтернативы можно взять метанол (4.6). Отмечается, что растворы в метаноле более чувствительны к щелочной среде на стеклянной поверхности и к дневному свету, чем растворы в толуоле/ацетонитриле.

Колбы плотно заворачивают в алюминиевую фольгу и хранят при температуре менее 4° С. Чтобы определить точную концентрацию афлатоксинов в этом исходном растворе, записывают кривую поглощения в интервале длин волн 330 нм и 370 нм в 1-см ячейках из кварцевого стекла (5.21) в спектрометре (5.20), с растворителем для исходного раствора в эталонной ячейке. Вычисляют массовую концентрацию каждого афлатоксина, c_a , в микрограммах на миллилитр, используя Уравнение (1):

$$c_a = A_{\max} \times \frac{M_a \times 100}{\varepsilon_a \times d} \quad (1)$$

where

A_{\max} спектральная поглощательная способность, определенная при максимуме кривой поглощения;

M_a молярная масса афлатоксина В₁, в граммах на моль (312 г/моль);

ε_a молярная поглощательная способность афлатоксина В₁, в квадратных метрах на моль (1930 м²/моль для раствора в толуоле/ацетонитриле и 2150 м²/моль для раствора в метаноле);

d оптическая длина пути ячейки, в сантиметрах.

4.17.2 Калибровочный исходный раствор

Приготавливают калибровочный раствор афлатоксина В₁ (4.16) с концентрацией 50,0 нг/мл или в толуоле/ацетонитриле (4.15) или в метаноле (4.6) из исходного раствора (4.17.1).

4.17.3 Вариант А (см 6.3)

Пипеткой переносят из калибровочного раствора (4.17.2) объемы, указанные в таблице 1 (Вариант А), в комплект из нескольких 20-мл калиброванных мерных колб. Выпаривают раствор толуола/ацетонитрила до полной сухости под струей азота при комнатной температуре. Если для приготовления исходного раствора используется метанол, выпаривание не требуется. В каждую колбу добавляют по 7 мл метанола. Дают афлатоксинам раствориться, затем разбавляют до метки водой и хорошо взбалтывают.

ПРИМЕЧАНИЕ Помните, что объемы метанола и воды сжимаются при смешивании.

4.17.4 Вариант В (см. 6.3)

Пипеткой переносят из калибровочного раствора (4.17.2) объемы, указанные в таблице 1 (Вариант В), в комплект как минимум из 5 различных 20-мл мерных колб. Выпаривают раствор толуола/ацетонитрила до полной сухости под струей азота при комнатной температуре. Если для приготовления исходного раствора используется метанол, выпаривание не требуется. В каждую колбу добавляют приблизительно по 10 мл метанола. Дают афлатоксинам раствориться, затем разбавляют чистым метанолом (не метанолом/водой) до метки и хорошо взбалтывают. Затем переносят точно 1 мл этого калибровочного рабочего раствора в промытую кислотой стеклянную пробирку (см. Предупреждение в 5.7), выпаривают до сухости согласно Варианту В (6.3.3) и затем повторно растворяют в точно таком же объеме, который будет использоваться для повторного растворения образцов перед их инъекцией (6.3). Вычисляют концентрацию В₁ после выпаривания и повторного растворения в нанограммах на миллилитр. Используют эти значения концентраций для вычисления согласно 6.6. В этом случае калибровочный диапазон останется неизменным.

ISO 17375:2006
<https://standards.globalspec.com/std/20219834/iso-17375-2006>
Таблица 1 — Приготовление калибровочных рабочих растворов

Рабочий стандартный раствор	Вариант А		Вариант В	
	Калибровочный исходный раствор мкл	Концентрация афлатоксина В ₁ нг/мл	Калибровочный исходный раствор мкл	Концентрация афлатоксина В ₁ нг/мл
1	20	0,050	100	0,250
2	70	0,175	350	0,875
3	120	0,300	600	1,500
4	170	0,425	850	2,125
5	220	0,550	1100	2,750

5 Аппаратура

Обычная лабораторная аппаратура и, в частности, следующая.

5.1 Вертикальный или горизонтальный встряхиватель, регулируемый.

5.2 Фильтровальная бумага, диаметром 24 см, предварительно фальцованная (например, целлюлоза для мелких осадков).

5.3 Колба Эрленмейера, с завинчивающейся крышкой или притертой стеклянной пробкой.

5.4 Фильтровальная бумага из стеклянного микро волокна, диаметром 5 см (например, удерживающая способность 1,6 мкм).

5.5 Резервуар, 75 мл с соединителем типа Люера для IAC.

5.6 Ручной насос, 20-мл шприц с замком Люера или резиновой пробкой для IAC.

5.7 Мерные колбы, емкостью 5 мл, 10 мл and 20 мл, с точностью как минимум 0,5 %.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Использование стеклянной посуды, не промытой кислотой (например, склянки, пробирки, колбы) для водных растворов афлатоксина может вызвать потерю афлатоксина. Особое внимание следует обратить на новую стеклянную посуду. Перед использованием следует опустить стеклянную посуду в разбавленную кислоту (например, серную кислоту, 2 моль/л) на несколько часов, затем тщательно промыть дистиллированной водой, чтобы удалить все следы кислоты (это можно проверить с помощью pH-бумаги).

5.8 Насос для HPLC, подходящий для скорости течения $(1,000 \pm 0,005)$ ml/min.

5.9 Инжекционная система.

Подходящая для инъекции с полной петлей (рекомендуется клапан с петлей 100 мкл). Должно быть гарантировано, что относительное стандартное отклонение (RSD) сигнала интегратора для многократной инъекции ($n = 10$) стандартного раствора афлатоксина B₁ (концентрация эквивалентна уровню загрязнения 1 мкг/кг) дает максимальное значение 10 %. Эти данные должны быть запротоколированы.

5.10 Колонка RP-HPLC, например LC-18 или ODS-2, с не обязательной, но рекомендованной предколонкой.

5.11 Система постколонной дериватизации с BVPB (альтернатива 5.12), включающая.

— второй безимпульсный насос HPLC,

— тройник нулевого мертвого объема и

— реакционную трубку с минимальным внутренним диаметром 45 см × 0,5 мм, из политетрафторэтилена.

Время реакции должно быть как минимум 4 с до детектирования.

5.12 Система для постколонной дериватизации HPLC с электрохимически образованным бромом.

Монтаж установки должен выполняться согласно инструкциям изготовителя. Для того чтобы проконтролировать содержание афлатоксина B₁, колонку HPLC отсоединяют от установки бромирования и непосредственно соединяют с флуоресцентным детектором.

Выключение электрического тока без отсоединения установки бромирования не рекомендуется, так как бром может остаться в ячеечной мембране установки для бромирования.

5.13 Флуоресцентный детектор, с фильтром возбуждения 360 нм и фильтром отсеки испускания > 420 нм, или с аналогичными.

Рекомендованные установки для регулируемых детекторов E_x = 365 нм, E_m = 435 нм, BW = 18 нм.

5.14 Одноразовая фильтровальная установка (0,45 мкм), до использования следует проверить, что во время фильтрования не происходит потери афлатоксина (испытание на восстановление), поскольку существует вероятность, что различные фильтровальные материалы могут удерживать афлатоксин B₁.

5.15 Пипетки с одной меткой, емкостью 1 мл, 2 мл, 5 мл и 10 мл.

5.16 Аналитические весы, взвешивающие с точностью до 0,1 мг.

5.17 Лабораторные весы, взвешивающие с точностью до 0,01 г.

5.18 Калиброванный(е) микролитровый(е) шприц(ы) или микролитровая(ые) пипетка(и), 20 мкл до 500 мкл.

5.19 Выпарной аппарат, необязательный, необходимый только для варианта В (6.3.3).

5.20 Спектрофотометр.

5.21 Ячейка из кварцевого стекла, длина оптического пути 1 см.

6 Процедуры

6.1 Кондиционирование IAC

IAC (4.11) должны быть при комнатной температуре перед кондиционированием. Кондиционирование следует проводить по инструкциям изготовителя. Если нет других указаний, наносят 10 мл PBS (4.2) сверху IAC и дают ему пройти со скоростью 2 мл/мин - 3 мл/мин через IAC (под действием силы тяжести). Нужно удостовериться, что небольшая порция (0,5 ml) PBS останется на IAC, до тех пор пока не будет нанесен раствор образца.

6.2 Экстракция

Отвешивают с точностью 0,1 г приблизительно 50 г испытуемого образца в 500-мл колбу Эрленмейера с завинчивающейся крышкой или притертой стеклянной пробкой. Добавляют 250 мл ацетона/воды в качестве экстракционного растворителя (4.9). Интенсивно встряхивают руками в первые 15 с до 30 с и затем в течение 30 мин с помощью встряхивателя (5.1). Фильтруют экстракт, используя предварительно фальцованную бумагу (5.2). Пипеткой (5.15) отмеряют 5,0 мл прозрачного фильтрата в 100-мл мерную колбу (5.7) и разбавляют до метки PBS или водой. Растворитель для разбавления (PBS или вода) отбирают согласно инструкциям изготовителя IAC. Если нет иных указаний, раствор должен быть приготовлен с помощью PBS. Если раствор не прозрачен, его фильтруют повторно через стекловолоконный фильтр (5.4) и переводят точно 50 мл прозрачного фильтрата в резервуар, который помещают на кондиционированную IAC. (Если раствор прозрачный, то разбавленный раствор можно непосредственно наносить на IAC.) Раствор наносят на IAC, как описано в 6.3.1.

6.3 Иммуноаффинная очистка

6.3.1 Общие вопросы

Методы для кондиционирования, нанесения, промывки и элюирования слегка различаются у разных изготовителей, и поэтому нужно строго следовать инструкциям, поставляемым с IAC. В целом процедуры включают экстрагирование образца метанолом/водой, фильтрование или центрифугирование, возможное разбавление образца посредством PBS или водой, наложение под давлением на (возможно, предварительно промытую) IAC, промывку IAC дистиллированной водой и элюирование афлатоксина В₁ метанолом или ацетонитрилом.

Пропускают фильтрат через IAC со скоростью течения приблизительно 1 капля в секунду (приблизительно 3 мл/мин) (сила тяжести). Нельзя допускать скорость течения выше 5 мл/мин. Промывают IAC, используя приблизительно 20 мл воды (4.8), наносимой двумя порциями примерно по 10 мл при скорости течения 3 мл/мин. Сушат, применяя легкий вакуум, от 5 с до 10 с или пропускают воздух через IAC шприцем в течение 10 с.

Элюируют афлатоксин В₁ посредством двухэтапной процедуры.