

ТЕХНИЧЕСКИЕ
УСЛОВИЯ

ISO/TS
27105

IDF/RM
216

Первое издание
2009-12-01

**Молоко и молочные продукты.
Определение содержания лизоцима
белка куриного яйца методом
высокоэффективной жидкостной
хроматографии (HPLC)**

*Milk and milk products — Determination of hen's egg white lysozyme by
HPLC*

ISO/TS 27105:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ceeb7ada-855b-4022-bdc1-7c8bdeae6a2f/iso-ts-27105-2009>

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



Ссылочные номера
ISO/TS 27105:2009(R)
IDF/RM 216:2009(R)

© ISO и IDF 2009

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. Ни Центральный секретариат ISO, ни IDF не несут 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 и национальными комитетами IDF. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 27105:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ceeb7ada-855b-4022-bdc1-7c8bdeae6a2f/iso-ts-27105-2009>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO и IDF 2009

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

International Dairy Federation
Diamant Building • Boulevard Auguste Reyers 80 • B-1030 Brussels
Tel. + 32 2 733 98 88
Fax + 32 2 733 04 13
E-mail info@fil-idf.org
Web www.fil-idf.org

Опубликовано в Швейцарии

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

При других обстоятельствах, особенно когда существует срочная потребность рынка в таких документах, технический комитет может принять решение о публикации других типов нормативного документа:

- общедоступные технические условия ISO (ISO/PAS) представляют собой соглашение между техническими экспертами в рабочей группе ISO и принимаются к публикации после одобрения более чем 50 % членов основного комитета, участвующих в голосовании;
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cee77ada-855b-4022-bdc1-7c8bdeae6a2f/iso->
- технические условия ISO (ISO/TS) представляют собой соглашение между членами технического комитета и принимаются к публикации после одобрения 2/3 членов комитета, участвующих в голосовании.

ISO/PAS или ISO/TS пересматриваются каждые три года для принятия решения либо о продлении их действия на следующие три года, либо о переработке для придания им статуса международного стандарта, либо о прекращении срока действия. Если принимается решение о продлении действия ISO/PAS или ISO/TS, они снова пересматриваются через следующие три года и тогда должны быть или преобразованы в международный стандарт или отменены.

Обращается внимание на то, что некоторые элементы данного документа могут быть объектом патентных прав. ISO не несет ответственности за идентификацию какого-либо одного или всех таких патентных прав.

ISO/TS 27105 | IDF/RM 216 были разработаны Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*, и Международной молочной федерацией (IDF). Они издаются совместно ISO и IDF.

Предисловие

Международная молочная федерация (IDF) является некоммерческой организацией, представляющей мировой молочный сектор. Членами IDF являются национальные комитеты в каждой стране-члене, а также региональные молочные ассоциации, подписавшие официальное соглашение о сотрудничестве с IDF. Все члены IDF имеют право быть представленными в постоянных комитетах IDF, выполняющих техническую работу. IDF сотрудничает с ISO в разработке стандартных методов анализа и отбора проб молока и молочных продуктов.

Главной задачей постоянных комитетов является разработка международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые рабочими группами и постоянными комитетами рассылаются национальным комитетам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 50% национальных комитетов, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего международного стандарта могут быть объектом патентных прав. IDF не несет ответственности за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ISO/TS 27105|IDF/RM 216 были подготовлены Международной молочной федерацией (IDF) и Техническим комитетом ISO/TC 34 *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5 *Молоко и молочные продукты*. Этот стандарт публикуется совместно IDF и ISO.

Вся работа была проделана Совместной инициативной группой ISO-IDF по *Пищевым добавкам и витаминам* Постоянного комитета по *Методам анализа добавок и контаминантов* под руководством главных разработчиков проекта Dr. T. Berger (Швейцария) и Prof. L. Pellegrino (Италия).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ceeb7ada-855b-4022-bdc1-7c8bdeae6a2f/iso-ts-27105-2009>

Молоко и молочные продукты. Определение содержания лизоцима белка куриного яйца методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC)

1 Область применения

Настоящие технические условия устанавливают метод для количественного определения лизоцима белка куриного яйца в молоке и молочных продуктах.

Этот метод является подходящим для измерения низких уровней лизоцима белка куриного яйца с количественным пределом 5 мг/кг.

2 Термины и определения

Применительно к настоящему документу используются следующие термины и определения.

2.1 содержание лизоцима белка куриного яйца hen's egg white lysozyme content

массовая доля вещества, определенная по процедуре, установленной в этих технических условиях

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ceeb7ada-855b-4022-bdc1-7c8bdeae6a2f/iso-27105-2009>
ПРИМЕЧАНИЕ Содержание лизоцима выражается в миллиграммах на килограмм.

3 Сущность метода

Казеин и денатурированный сывороточный белок осаждают из молочных продуктов в изоэлектрической точке при pH 4,3 (сыр и твердые молочные продукты) или при pH 2,2 (молоко и жидкие молочные продукты). Лизоцим белка куриного яйца, растворимый в кислоте, затем определяют с использованием обращено-фазовой HPLC и флуоресцентного детектирования. Пик лизоцима может быть верифицирован с помощью системы LC/MS (жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии) (см. приложение А).

4 Реактивы и стандартные вещества

Используются реактивы только признанной аналитической чистоты, если нет других указаний, и только дистиллированная вода или вода эквивалентной чистоты.

4.1 Реактивы

4.1.1 Раствор хлорида натрия, $c(\text{NaCl}) = 1$ моль/л.

Растворяют 58,44 г хлорида натрия в 1 л воды.

4.1.2 Раствор соляной кислоты, $c(\text{HCl}) = 1$ моль/л.

Добавляют 4,0 мл соляной кислоты с массовой долей 37 % в мерную колбу с одной меткой вместимостью 50 мл (5.9). Дополняют до метки водой и перемешивают.

4.1.3 Раствор гидроксида натрия, $c(\text{NaOH}) = 1$ моль/л.

Добавляют 2,6 мл соляной кислоты с массовой долей 50 % в мерную колбу с одной меткой вместимостью 50 мл (5.9). Дополняют до метки водой и перемешивают.

4.1.4 Трифторуксусная кислота (CF_3COOH).

4.1.5 Ацетонитрил (CH_3CN), класс HPLC .

4.1.6 Вода, класс HPLC.

4.2 Лизоцим

Чистый лизоцим белка куриного яйца¹⁾.

ПРИМЕЧАНИЕ Лизоцим (ЕС 3.2.1.17, мурамидаза) является ферментом, широко распространенным в природе, например в белке куриного яйца (приблизительно от 3 г/100 г до 4 г/100 г), слюне и слезной жидкости. Лизоцим обладает защитной функцией, оказывая литическое (разрушающее) действие на стенку клеток некоторых бактерий. Лизоцим белка куриного яйца используется при изготовлении сыров, чтобы предотвратить позднее вспучивание в полутвердых и твердых сырах.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5 Оборудование и материалы

Используется обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее.

5.1 pH-метр.

5.2 Гофрированный фильтр, диаметром 150 мм²⁾.

5.3 Мембранный фильтр, размер пор 0,22 мкм³⁾.

5.4 Весы, обеспечивающие взвешивание с точностью до 100 мг, считываемость до 10 мг.

5.5 Аналитические весы, обеспечивающие взвешивание с точностью до 0,1 мг, считываемость до 0,01 мг.

5.6 Магнитная мешалка.

5.7 Гомогенизатор, обеспечивающий частоту вращения от 2 500 об/мин до 3 000 об/мин.

1) Sigma L-7651 является примером подходящего продукта, имеющегося в продаже. Эта информация дается только для удобства пользователей этих технических условий и не является поддержкой данного продукта со стороны ISO или IDF.

2) Schleicher & Schuell 595½ является примером подходящего продукта, имеющегося в продаже. Эта информация дается только для удобства пользователей этих технических условий и не является поддержкой данного продукта со стороны ISO или IDF

3) Millex-GV PVDF 0,22 мкм является примером подходящего продукта, имеющегося в продаже. Эта информация дается только для удобства пользователей этих технических условий и не является поддержкой данного продукта со стороны ISO или IDF.

5.8 HPLC оборудование.

5.8.1 Насосная система с формированием градиента элюирования, обеспечивающая скорость течения 1,0 мл/мин.

5.8.2 Ручной или автоматический инжектор, обеспечивающий объемы инжектирования 50 мкл.

5.8.3 Нагреватель колонки, способный поддерживать температуру колонки при $45\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

5.8.4 Колонка для обращено-фазовой хроматографии, PLRP-S 300 Å⁴⁾ 5 мкм, 250 мм × 4,6 мм.

5.8.5 Флуоресцентный детектор, обеспечивающий работу при возбуждении 280 нм и излучении 340 нм.

5.9 Мерные колбы с одной меткой вместимостью 10 мл и 50 мл, ISO 1042 [2] класс А.

6 Отбор проб

В лабораторию должна быть отправлена репрезентативная проба. Она не должна быть повреждена или изменена во время транспортировки или хранения.

Отбор проб не является частью метода, установленного в этом международном стандарте. Рекомендованный метод отбора проб дан в ISO 707 | IDF 50^[1].

7 Процедура

7.1 Приготовление стандартного раствора лизоцима

7.1.1 Стандартный исходный раствор лизоцима

Навеску лизоцима массой 10 мг с точностью до 0,01 мг (4.2) помещают в мерную колбу с одной меткой вместимостью 10 мл (5.9). Дополняют до метки раствором хлорида натрия (4.1.1) и перемешивают.

Готовят стандартные исходные растворы в день использования.

7.1.2 Стандартный рабочий раствор лизоцима

Пипеткой вводят 80 мкл стандартного исходного раствора лизоцима (7.1.1) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 10 мл (5.9). Дополняют до метки раствором хлорида натрия (4.1.1) и перемешивают.

Полученный таким образом стандартный рабочий раствор лизоцима содержит 8,0 мг лизоцима на литр.

4) PLRP-S 300 Å является торговым названием продукта, поставляемого компанией Polymer Laboratories, Ltd. Эта информация дается только для удобства пользователей этих технических условий и не является поддержкой данного продукта со стороны ISO или IDF. Можно использовать аналогичные продукты, если есть данные, что они приведут к таким же результатам.

7.2 Испытательный образец

7.2.1 Молоко или другой жидкий молочный продукт

Из испытываемой пробы берут навеску массой 10,00 г с точностью до 0,01 г и вводят в лабораторный стакан вместимостью 100 мл.

7.2.2 Сыр или другой твердый молочный продукт

Перед взвешиванием испытываемые пробы сыра растирают на терке. Берут навеску массой 2,00 г с точностью до 0,01 г и помещают в лабораторный стакан вместимостью 100 мл.

ПРИМЕЧАНИЕ Мягкий сыр можно натереть на терке после замораживания.

7.2.3 Приготовление испытательного образца

Добавляют 20 мл раствора хлорида натрия (4.1.1) к испытательному образцу (7.2.1 или 7.2.2) и перемешивают. Регулируют pH полученного раствора до pH 6,0, добавляя по капле раствор гидроксида натрия (4.1.3).

Диспергируют испытательный образец в течение 30 с, используя гомогенизатор (5.7) при частоте 2 500 об/мин до 3 000 об/мин. Промывают гомогенизатор в отдельном лабораторном стакане вместимостью 100 мл, используя 10 мл раствора хлорида натрия (4.1.1). Добавляют остатки промывки к испытываемому раствору.

Перемешивают испытываемый раствор в стакане на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение 1 ч. С помощью соляной кислоты (4.1.2) регулируют pH испытательного образца, полученного из молока и жидких молочных продуктов (7.2.1), до pH 2,2 и испытательного образца, полученного из сыра и твердых молочных продуктов, до pH 4,3.

Помещают испытываемый раствор в мерную колбу с одной меткой вместимостью 50 мл (5.9). Используют раствор хлорида натрия (4.1.1) для промывки лабораторного стакана вместимостью 100 мл. Разбавляют до метки раствором хлорида натрия (4.1.1) и перемешивают.

Оставляют испытываемый раствор при комнатной температуре на 15 мин.

Затем фильтруют испытываемый раствор через гофрированный фильтр (5.2) и после этого через мембранный фильтр (5.3) непосредственно в HPLC ампулу.

7.3 HPLC определение

7.3.1 Хроматографические условия

Готовят следующее:

- 1) исходный раствор I: 1 мл трифторуксусной кислоты (4.1.4) в 1 л воды (4.1.6).
- 2) исходный раствор II: 1 мл трифторуксусной кислоты (4.1.4) в 1 л ацетонитрила (4.1.5).

Используют следующее для HPLC:

- 1) растворитель для элюирования А (элюент), содержащий: исходные растворы I и II с отношением массовых долей I к II 100:38,4.
- 2) растворитель для элюирования В (элюент), содержащий: исходный раствор II.

Градиент элюирования предлагается в Таблице 1.

Таблица 1 — Предлагаемый градиент элюирования

Время мин	Элюент А ^а %	Элюент В ^а %
0,0	100	0
20,0	100	0
21,0	50	50
22,0	50	50
23,0	100	0
35,0	100	0

^а Может потребоваться незначительная модификация градиента элюирования, для того чтобы получить разрешение, показанное на Рисунке 1.

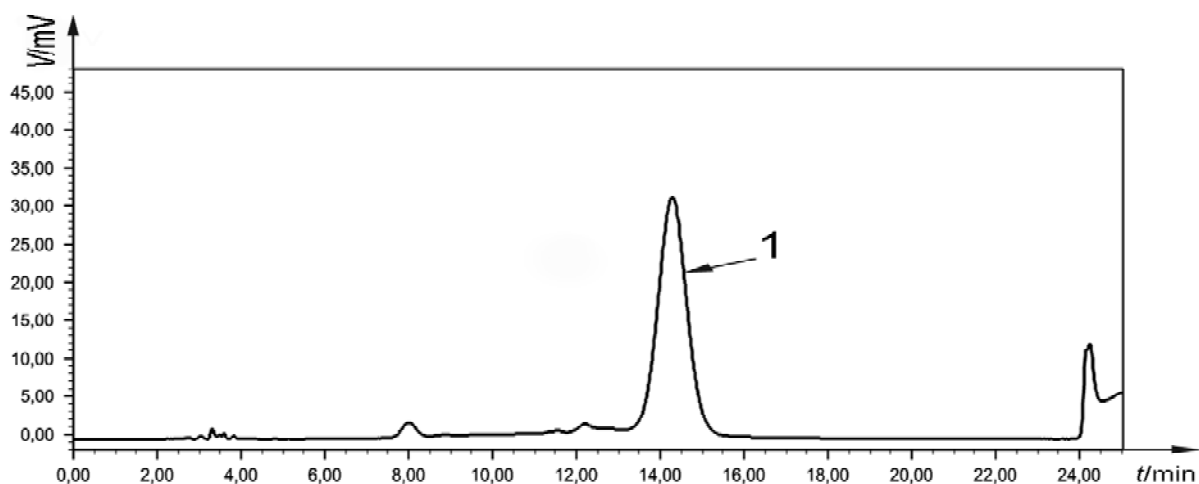
Устанавливают расход насосной системы, формирующей градиент элюирования, для HPLC оборудования на 1,0 мл/мин.

Устанавливают температуру нагревателя колонки на 45 °С. Определяют время установления равновесия путем мониторинга элюирования колонки.

Чувствительность детектора в конце испытания (базовая линия) должна быть равна его начальному значению. Изократическое промывание в течение 15 мин обычно достаточна.

Инжекция: Используют ручной или автоматический инжектор для ввода 50 мкл растворов (7.2.3) в колонку.

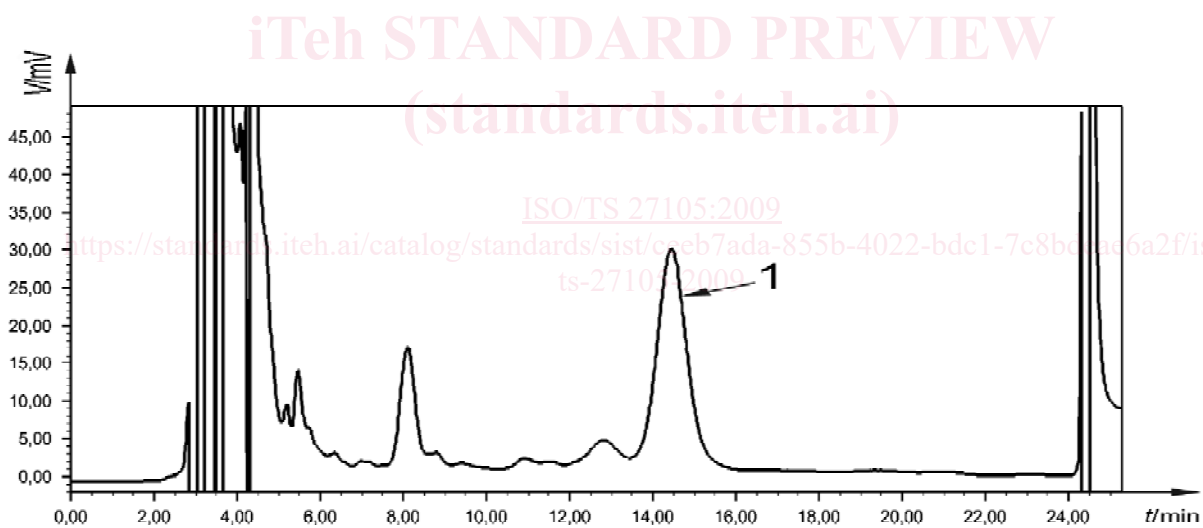
HPLC флуоресцентные сигналы от стандартного рабочего раствора (7.1.2) и пробы твердого сыра (7.2.3) показаны на Рисунках 1 и 2.



Обозначение

- t время
- V максимальный отклик
- 1 лизоцим

Рисунок 1 — HPLC флуоресцентный сигнал от стандартного рабочего раствора (7.1.2)



Обозначение

- t время
- V максимальный отклик
- 1 лизоцим

Рисунок 2 — HPLC флуоресцентный сигнал от пробы твердого сыра