
**Сыр. Определение содержания низина
А с применением жидкостной
хроматографии - масс-спектрометрии
(LS-MS) и жидкостной хроматографии -
танDEMной - масс - спектрометрии (LS-
MS-MS)**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Cheese — Determination of nisin A content by LC-MS and LC-MS-MS

ISO/TS 27106:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ec094b1-bf9f-4aef-ad86-8af75e004c2a/iso-ts-27106-2009>

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



Ссылочные номера
ISO/TS 27106:2009(R)
IDF/RM 217:2009(R)

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 27106:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ec094b1-bf9f-4aef-ad86-8af75e004c2a/iso-ts-27106-2009>



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;
- 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 27106 | IDF/RM 217 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 27106|IDF/RM 217 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 разработчика проекта Mr. T. Berger (Швейцария)

[ISO/TS 27106:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ec094b1-bf9f-4aef-ad86-8af75e004c2a/iso-ts-27106-2009)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ec094b1-bf9f-4aef-ad86-8af75e004c2a/iso-ts-27106-2009>

Сыр. Определение содержания низина А с применением жидкостной хроматографии - масс-спектрологии (LS-MS) и жидкостной хроматографии - тандемной - масс - спектрологии (LS-MS-MS)

1 Область применения

Настоящие технические условия устанавливают метод для количественного определения низина А в сыре.

Этот метод является подходящим для измерения низких уровней низина А с количественным пределом 1 мг/кг.

ПРИМЕЧАНИЕ Низин является пептидом, образуемым некоторыми бактериями (например, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*), замедляющим или разрушающим другие микроорганизмы. Он широко используется как естественный консервант для пищевых продуктов, например овощей, сыра, мяса и какао. В сыроделии низин используется для предотвращения позднего вспучивания. Его использование ограничено максимальными уровнями в окончательном продукте. Низин образуется в двух формах, низин А и низин Z, которые различаются одной аминокислотой. Этот метод применим только для определения низина А.

2 Термины и определения

Применительно к настоящему документу используются следующие термины и определения.

2.1

содержание низина А

nisin A content

массовая доля вещества, определенная методом, установленным в этих технических условиях

ПРИМЕЧАНИЕ Содержание низина А выражается в миллиграммах на килограмм.

3 Сущность метода

Пробу растирают и экстрагируют с помощью муравьиной кислоты при 80 °С. После ультрацентрифугирования интерферирующие белки отделяют посредством фильтрования через ультрафильтрующую (UF) мембрану. В очищенном экстракте низин А отделяют, используя полимерную стационарную фазу, и детектируют методом масс-спектрометрии (с использованием MS-MS как опции).

4 Реактивы и стандартные вещества

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

4.1 Исходный раствор коровьего сывороточного альбумина (BSA). Растворяют 10 мг BSA (чистота > 96 % массовой доли), в 10 мл воды.

4.2 Буферный раствор коровьего сывороточного альбумина (BSA). Смешивают 80 мл воды с 20 мл ацетонитрила (4.6), 0,5 мл муравьиной кислоты (4.3), 0,01 мл трифторуксусной кислоты (4.5) и 1 мл исходного раствора BSA (4.1).

4.3 Муравьиная кислота (HCOOH).

4.4 Раствор муравьиной кислоты, $\rho_{\text{HCOOH}} = 5 \text{ g/l}$. Пипеткой вводят 0,41 мл муравьиной кислоты (4.3) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 100 мл (5.12). Дополняют до метки водой и перемешивают.

4.5 Трифторуксусная кислота (CF₃COOH).

4.6 Ацетонитрил (CH₃CN), "чистый".

4.7 Метанол (CH₃OH).

4.8 Нисин А, чистотой > 95 % массовой доли¹⁾.

5 Оборудование

Используется обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее.

5.1 Лабораторная центрифуга, обеспечивающая создание радиального ускорения как минимум 3 000g.

5.2 Ультрацентрифуга, создающая радиальное ускорение 20 800g.

5.3 Ультрафильтрующая мембрана, коэффициент распределения по размеру пор 30 kD²⁾.

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

5.5 Весы, обеспечивающие взвешивание с точностью до 10 мг, считываемость до 1 мг.

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

5.7 Водяная баня, обеспечивающая встряхивание и поддержание температуры 80 °C ± 2 °C.

5.8 Ультразвуковая ванна, обеспечивающая встряхивание и поддержание температуры 80 °C ± 2 °C.

5.9 Терка для сыра, с размером отверстий приблизительно 2 мм.

5.10 LC-MS оборудование.

1) Ambicin N 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) Millipore Centricon YM-30 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) Millipore 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.

5.10.1 Насосная система с формированием градиента элюирования, обеспечивающая работу при 0,25 мл/мин.

5.10.2 Ручной или автоматический инжектор, обеспечивающий объемы инжестирования 5 мкл.

5.10.3 Нагреватель колонки, способный поддерживать температуру колонки при $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.10.4 Колонка, обращенная фаза, PLRP-S, 300 Å⁴), 3 мкм, 150 мм × 2 мм.

5.10.5 Масс-спектрометрический детектор, обеспечивающий работу в режиме ионизации ESI+ при m/z 839,6.

5.11 LC-MS-MS оборудование (факультативное).

5.11.1 Насосная система с формированием градиента элюирования, обеспечивающая расход 0,2 мл/мин.

5.11.2 Ручной или автоматический инжектор, обеспечивающий инжестирующие объемы 10 мкл.

5.11.3 Нагреватель колонки, поддерживающий температуру колонки при $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.11.4 Колонка для обращено-фазовой хроматографии, PLRP-S, 300 Å⁴), 3 мкм, 150 × 2 мм.

5.11.5 Масс-спектрометрический детектор, обеспечивающий работу в режиме ионизации ESI+ MS-MS при m/z 672/672, 672/811, 672/649, 840/840.

5.12 Мерные колбы с одной меткой вместимостью 100 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 низина А

7.1.1 Стандартный исходный раствор низина А, $\rho_{\text{нА}} = 100$ мг/л.

Навеску низина А массой 10,00 мг с точностью до 0,01 мг (4.8) помещают в мерную колбу с одной меткой вместимостью 100 мл (5.12). Дополняют до метки раствором муравьиной кислоты (4.4) и перемешивают.

Стандартный раствор низина А готовят ежедневно.

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.

7.1.2 Стандартный рабочий раствор низина А, $\rho_{нА} = 300$ мкг/л

Пипеткой вводят 300 мкл стандартного исходного раствора низина А (7.1.1) в мерную колбу с одной меткой вместимостью 100 мл (5.12). Дополняют до метки буферным раствором BSA (4.2) и перемешивают. Полученный таким образом стандартный рабочий раствор содержит 300 мкг низина А на литр.

Стандартный рабочий раствор низина А готовят ежедневно.

7.2 Экстрагирование испытательного образца

Перед взвешиванием испытываемую пробу сыра растирают на терке (5.9).

Навеску массой 2,50 г с точностью до 0,01 г помещают в мерную колбу с одной меткой вместимостью 100 мл (5.12). Добавляют 70 мл воды и 0,5 мл муравьиной кислоты (4.3) и перемешивают.

Колбу помещают или в водяную баню (5.7) при 80 °С и встряхивают в течение 30 мин или в ультразвуковую баню (5.8) при 80 °С и встряхивают в течение 10 мин. После охлаждения до комнатной температуры дополняют до метки водой и перемешивают.

ПРИМЕЧАНИЕ Мягкий сыр можно натирать после замораживания.

7.3 Фильтрация испытательного образца посредством ультрафильтрующей мембраны

Пипеткой вводят приблизительно 1,5 мл экстракта в пробирку вместимостью 1,5 мл (например, Eppendorf) и центрифугируют с использованием центрифуги (5.2) при 20 800g в течение 10 мин.

Определяют вес приемного контейнера для ультрафильтрующей мембраны (5.3) на аналитических весах (5.6). Помещают приемный контейнер на ультрафильтрующую мембрану и устанавливают аналитические весы на ноль.

Фильтруют 0,6 мл до 0,7 мл центрифугированного экстракта через мембранный фильтр (5.4) в тарированную ультрафильтрующую мембрану.

Взвешивают количество экстракта на ультрафильтрующей мембране, используя аналитические весы. Центрифугируют ультрафильтрующую мембрану в лабораторной центрифуге (5.1) при 3 000g в течение 45 мин. Определяют брутто-массу контейнера фильтра.

Дополняют массу нетто фильтрата водой до первоначального количества, взвешенного с поправкой на распределение пептида в ультрафильтрующей мембране.

ПРИМЕЧАНИЕ Обычно количество добавляемой воды составляет приблизительно 15 % от экстракта, используемого для центрифугирования. Для консультации следует использовать информацию, предоставленную производителем мембраны.

Полученный таким образом фильтрат переносят в HPLC ампулу и измеряют.

7.4 Определение методом LC-MS и LC-MS-MS

7.4.1 Растворители для элюирования (элюенты) для LC-MS

Используют следующие элюенты:

Элюент А: пипеткой вводят 2,5 мл муравьиной кислоты (4.3) и 0,05 мл трифторуксусной кислоты (4.5) в 500 мл воды.

Элюент В: смешивают 350 мл ацетонитрила (4.6) и 150 мл воды, 2,5 мл муравьиной кислоты (4.3) и 0,05 мл трифторуксусной кислоты (4.5).

7.4.2 Растворители для элюирования (элюенты) для LC-MS-MS

Факультативно можно использовать следующие элюенты, если выбрана система LC-MS-MS:

Элюент С: смешивают 50 мл ацетонитрила (4.6) с 450 мл воды и 2,5 мл муравьиной кислоты (4.3).

Элюент D: смешивают 400 мл ацетонитрила (4.6), 100 мл воды и 2,5 мл муравьиной кислоты (4.3).

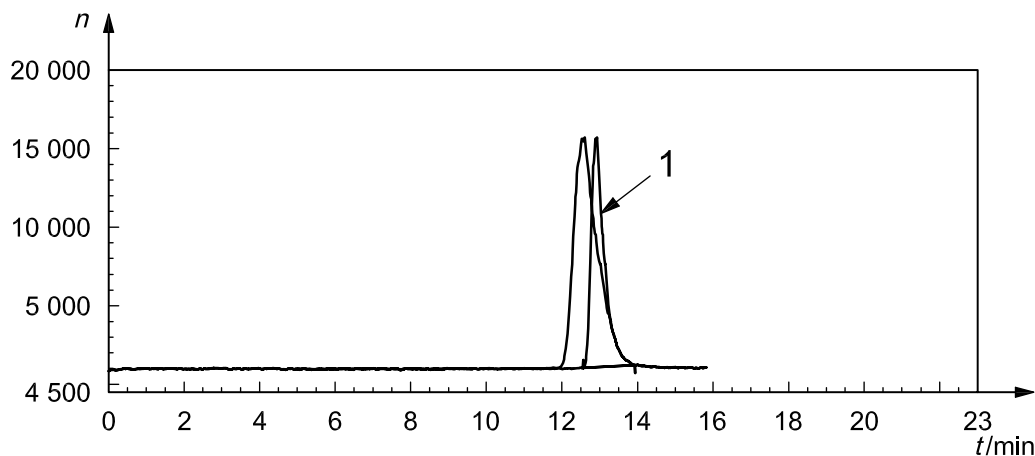
7.4.3 LC-MS и LC-MS-MS условия

Таблица 1 — Предпочтительные условия

Условия	LC-MS			LC-MS-MS		
	Объем инъектирования, мкл	5			10	
Колонка	PLRP-S ⁴⁾ 150 мм × 2 мм, 300 Å, 3 мкм					
Температура колонки, °C	40			30		
Масс-спектрометрический детектор	Режим ионизации ESI+ Проба 500 °C Игла 3,5 кВ			Режим ионизации ESI+ Азот 8 л/мин 350 °C		
Детектирование	<i>m/z</i> 839,6 ^a Диапазон 0,5 Время запаздывания 1,0 мин Конус 60 V			<i>m/z</i> Q1/ <i>m/z</i> Q3 672/672 ^b 672/811 ^c (наиболее избирательный переход) 672/649 840/840 ^b		
Расход, мл/мин	0,25			0,20		
Время удержания низина, мин	~13			~5,7		
Градиент ^d	Мин.	%A	%B	Мин.	%C	%D
	0	70	30	0	85	15
	13	50	50	1	85	15
	13,1	0	100	4	65	35
	17	0	100	6	65	35
	17,1	70	30	9	10	90
	23	70	30	12	10	90
				12,1	85	15
			16	85	15	
В целом MS или MS-MS параметры являются критическими и должны тщательно регулироваться для получения чувствительности и повторяемости при различных аналитических факторах. Прибор следует оптимизировать, чтобы получить самый высокий сигнал для низина.						
^a Более высокие чувствительности для ионов <i>m/z</i> 1 118,9+3 ([M+3H] ³⁺) или <i>m/z</i> 1 677,7+2 ([M+2H] ²⁺) были измерены в других лабораториях и могли использоваться альтернативно.						
^b Идентичный сигнал <i>m/z</i> , оборудование для MS-MS должно быть оптимизировано.						
^c Из-за более низкого заряда иона более высокий сигнал <i>m/z</i> возникает в Q3.						
^d Может потребоваться незначительная модификация градиента для получения разрешения, показанного на Рисунке 1.						

7.4.4 Калибровка LC-MS

Пример хроматограммы стандартного раствора низина А дан на Рисунке 1. Хроматограмма была получена путем трехкратного измерения стандартного рабочего раствора низина А (7.1.2). Пример показывает, что калибровка является линейной для всего диапазона измерения (см. Рисунок 2). Тем не менее линейность оборудования следует регулярно проверять.



Обозначение

n счет

t время

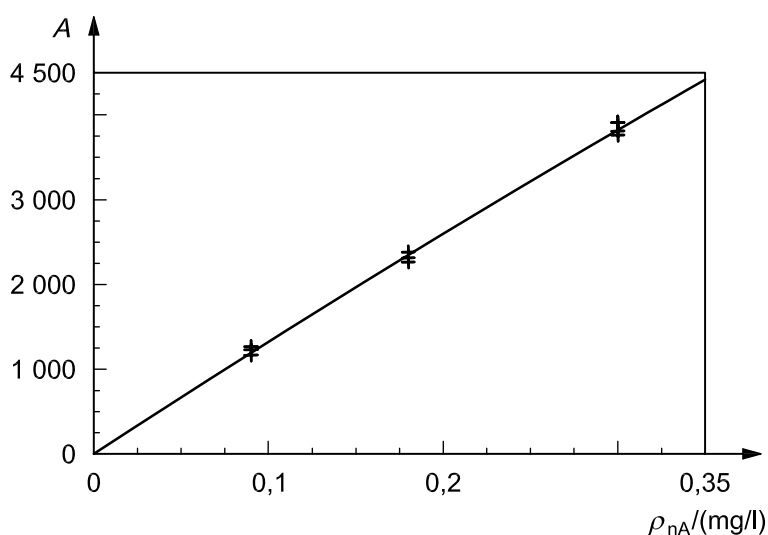
1 низин А

SIM_01 60,0 положительный; m/z от 839,34 до 839,84

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Рисунок 1 — Стандартный рабочий раствор низина А, измеренный в системе LC-MS

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ec094b1-bf9f-4aef-ad86-8af75e004c2a/iso-ts-27106-2009>



Обозначение

A область (отсчет времени, в минутах)

ρ_{nA} массовая концентрация низина А

$[\text{nisin} + 4\text{H}]^{4+}$ внешний SIM_01

Рисунок 2 — Калибровка низина А при m/z 839,6 в системе LC-MS