ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ГОСТ Р 52828— 2007**

# ВИНА И ВИНОМАТЕРИАЛЫ

## Определение содержания охратоксина А Метод тонкослойной хроматографии

Издание официальное

Б3 1—2008/512

Москва
Стандартинформ
2008

gost.e-ecolog.ru

## Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

**Сведения о стандарте**

1 РАЗРАБОТАН ГНУ «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства» Россельхозакадемии, г. Краснодар

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2007 г. № 455-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет*

© Стандартинформ, 2008

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

## Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Отбор проб . . . 2
4 Сущность метода . . . 2
5 Метрологические характеристики . . . 2
5.1 Диапазон измерения . . . 2
5.2 Прецизионность метода . . . 2
6 Требования к условиям выполнения измерений . . . 3
7 Требования безопасности . . . 3
8 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы . . . 3
9 Подготовка к испытанию . . . 4
9.1 Подготовка анализируемой пробы к испытанию . . . 4
9.2 Приготовление элюента для тонкослойной хроматографии . . . 4
9.3 Приготовление градуировочного раствора . . . 4
9.4 Подготовка хроматографической камеры . . . 4
9.5 Подготовка хроматографических пластин . . . 4
9.6 Подготовка денситометра к выполнению измерений . . . 5
9.7 Подготовка концентрирующих патронов . . . 5
10 Проведение испытаний . . . 5
10.1 Нанесение анализируемой пробы на хроматографическую пластину . . . 5
10.2 Хроматографическое разделение . . . 5
10.3 Экспонирование и обработка изображения хроматограмм . . . 5
11 Обработка и оформление результатов измерений . . . 5
11.1 Подтверждение наличия охратоксина А . . . 5
11.2 Количественное определение содержания охратоксина А . . . 5
Библиография . . . 7

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

# ВИНА И ВИНОМАТЕРИАЛЫ

## Определение содержания охратоксина А
## Метод тонкослойной хроматографии

Wines and winestocks.
Determination of ohratoxin A content. Method of thin-layer chromatography

**Дата введения — 2009—01—01**

## 1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на вина и виноматериалы и устанавливает метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) определения массовой концентрации охратоксина А в диапазоне измерений от 0,1 до 1,0 мкг/см$^3$.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

ГОСТ Р 51144—98 Продукты винодельческой промышленности. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.018—93 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 12.1.019—79 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009—83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021—75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 1770—74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2603—79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3760—79 Реактивы. Аммиак водный. Технические условия

ГОСТ 5955—75 Реактивы. Бензол. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9805—84 Спирт изопропиловый. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 24104—2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

ГОСТ 24861—91 Шприцы инъекционные однократного применения

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 28498—90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 29227—91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

## 3 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ Р 51144.

## 4 Сущность метода

Метод основан на сорбции охратоксина А из анализируемых проб вина и виноматериалов концентрирующим патроном Диапак С16М или аналогичным патроном с гидрофобным сорбентом с привитыми гексадецильными С16 группами, десорбции ацетонитрилом с последующим определением его методом ТСХ.

Идентификацию и количественное определение охратоксина А следует проводить методом сканирующей денситометрии.

## 5 Метрологические характеристики

### 5.1 Диапазон измерения

Диапазон измерений массовой концентрации охратоксина А методом ТСХ в вине и виноматериалах находится в пределах от 0,1 до 1,0 мкг/см$^3$.

### 5.2 Прецизионность метода

Показатели прецизионности метода определены в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-2 и представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Показатели прецизионности метода ТСХ определения охратоксина А

| Наименование показателей прецизионности | Значение показателя |
|---|---|
| Предел повторяемости $r$, %, $P$ = 0,95 | 42 |
| Предел промежуточной прецизионности $R_{I(TOE)\ отн}$, %, $P$ = 0,95 | 50 |
| Границы относительной погрешности результата при вероятности $P$ = 0,95 ± $\delta$, % | 36 |

Расхождение между результатами двух параллельных определений, полученных в условиях повторяемости, может превышать предел повторяемости $r$ не более одного раза из двадцати.

Расхождение двух результатов анализа, полученных в условиях промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности (разное время, разные операторы, разное оборудование), может превышать предел промежуточной прецизионности $R_{I(TOE)}$ не более одного раза из двадцати.

## 6 Требования к условиям выполнения измерений

6.1 Подготовку лабораторных проб и определение охратоксина А проводят при температуре окружающего воздуха (23 ± 5) °С, атмосферном давлении от 87 до 107 кПа, относительной влажности воздуха не более 80 %, частоте переменного тока (50,0 ± 0,4) Гц, напряжении в сети 220 В.

## 7 Требования безопасности

7.1 При проведении работ необходимо соблюдать правила техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

7.2 При работе с электроустановками электробезопасность должна соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.018 и ГОСТ 12.1.019, а также требованиям, изложенным в инструкции по эксплуатации денситометра.

7.3 Помещение, в котором проводятся работы, должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021; содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать нормы, установленные ГОСТ 12.1.005, а также должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

**7.4 Требования к квалификации оператора**

К работе допускаются специалисты, имеющие высшее или среднее специальное химическое образование и владеющие техникой выполнения анализов с применением ТСХ.

## 8 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы

Весы лабораторные по ГОСТ 24104 высокого класса точности с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 0,0001.

Система для ТСХ с денситометром [1]*.

Денситометр с соответствующей системой обработки данных, включающей программное обеспечение, способный рассчитывать любую хроматограмму, видимую в дневном или ультрафиолетовом свете с длинами волн 254 и 365 нм.

Камера хроматографическая под пластины 10 × 10 см.

Аппликатор механический в комплекте с нагревательным устройством УСП-1М и микрошприцем М-10Н.

Трафарет, предназначенный для предварительной разметки хроматографических пластин или для прямого нанесения проб на пластины.

Пластины для ТСХ на полимерной основе (полиэтилентерефталат) или алюминиевой подложке размером 10 × 10 см.

Сушильный шкаф с диапазоном температур в рабочей камере от 40 °С до 200 °С и основной погрешностью стабилизации температуры ± 1 °С.

Колбы мерные 2-50-2, 2-100-2, 4-100-2 по ГОСТ 1770.

Стакан В-1 — 25 ТХС или Н-1 — 25 ТХС по ГОСТ 25336.

Пипетки градуированные 3-2-2-1, 3-2-2-5 по ГОСТ 29227.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Концентрирующий патрон Диапак С16М (одноразовый), Диапак С16МТ (используемый до пяти раз) в виде разъемных капсул с фиксированным слоем сорбента объемом 1 $см^3$ и/или в виде колонок объемом 10 $см^3$, частично заполненных сорбентом объемом обычно 3 $см^3$.

Шприцы медицинские инъекционные по ГОСТ 24861 вместимостью 5 и 10 $см^3$.

Термометр жидкостный стеклянный с диапазоном измерения от 0 °С до 50 °С и ценой деления 1 °С по ГОСТ 28498.

Стандартный образец состава раствора охратоксина А ГСО 7941 в смеси бензола и уксусной кислоты (объемное соотношение 99:1) номинального значения массовой концентрации 50 мкг/$см^3$ и погрешностью аттестованного значения не более ± 5 %.

Ацетонитрил ОП-3 ос.ч. с массовой долей основного вещества не менее 99,90 %.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

---

* Эта информация дана для сведения пользователей настоящего стандарта и не означает, что стандарт устанавливает обязательное применение денситометра «Сорбфил».

Ацетон по ГОСТ 2603.
Аммиак водный по ГОСТ 3760, ч.д.а.
Спирт изопропиловый по ГОСТ 9805.
Бензол по ГОСТ 5955.
Кислота уксусная по ГОСТ 61.
Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования с аналогичными метрологическими и техническими характеристиками, а также материалов и реактивов по качеству не хуже вышеуказанных в разделе 8.

## 9 Подготовка к испытанию

### 9.1 Подготовка анализируемой пробы к испытанию

Анализируемую пробу вина или виноматериала в объеме 10 см³ набирают инъекционным шприцем однократного применения, соединяют шприц с концентрирующим патроном Диапак С 16М или Диапак С16МТ, подготовленными по 9.7. Пропускают пробу через патрон по одной капле со скоростью от 10 до 20 капель в минуту. Затем для десорбции охратоксина А через патрон пропускается 1 см³ ацетонитрила со скоростью от 10 до 20 капель в минуту. Элюат собирают в стакан вместимостью 25 см³. Элюат анализируемой пробы используют в хроматографическом анализе.

### 9.2 Приготовление элюента для тонкослойной хроматографии

Состав элюента для определения охратоксина А состоит из двух реактивов: изопропилового спирта и водного раствора массовой долей аммиака 25 %, которые отбирают мерными пипетками в соотношении объемов 4:1.

В мерную колбу вместимостью 50 см³ вносят мерными пипетками индивидуально для каждого реактива 4 см³ изопропилового спирта и 1 см³ водного раствора аммиака. Колбу закрывают стеклянной пробкой и тщательно перемешивают.

Раствор готовят непосредственно перед его использованием

### 9.3 Приготовление градуировочного раствора

Для приготовления градуировочных растворов массовой концентрацией охратоксина А 1, 2, 3, 5 мкг/см³ ампулу со стандартным образцом вскрывают, отбирают мерными пипетками 0,5, 1, 1,5 и 2,5 см³ раствора стандартного образца и вносят в четыре мерные колбы вместимостью 25 см³. Доводят объем раствора в мерной колбе до метки растворителем, приготовленным из бензола и уксусной кислоты в соотношении — 99:1 при температуре окружающей среды 20 °С.

Значение концентрации приготовленного раствора охратоксина А $C$, мкг/см³, рассчитывают по формуле

$$C = \frac{A \cdot V_1}{V_2}, \qquad (1)$$

где $A$ — аттестованное значение ГСО, мкг/см³;
$V_1$ — объем раствора, отмеряемый мерной пипеткой, см³;
$V_2$ — объем мерной колбы, см³.

Градуировочные растворы хранят не более 10 дней при температуре не выше 5 °С в защищенном от света месте.

### 9.4 Подготовка хроматографической камеры

В хроматографическую камеру вносят элюент, подготовленный по 9.2, толщина слоя которого должна составлять 4—5 мм.

В камеру помещают два куска фильтровальной бумаги размером 10 × 10 см, которыми закрывают переднюю и заднюю стенки камеры, начиная с ее дна.

Камеру закрывают крышкой для насыщения объема парами элюента. Через 20—30 мин камера готова к проведению хроматографического разделения.

### 9.5 Подготовка хроматографических пластин

Перед проведением анализа пластины активируют в сушильном шкафу при температуре 90 °С—100 °С в течение 1 ч.

При дальнейшей подготовке пластины учитывают направление хроматографирования, перпендикулярное к рискам-царапинам на обратной стороне подложки пластины (пленка на фольге).

Для обеспечения равномерного подъема фронта элюента перед выполнением анализа срезают углы в нижней части пластины на 6—8 мм под углом 45°.

Для повышения точности анализа и эффективности пластин проводят их очистку концентрированным раствором аммиака или ацетона. Для очистки пластину помещают и выдерживают в хроматографи-

ческой камере, заполненной раствором аммиака или ацетона на 8—10 мм, до тех пор, пока фронт элюента не достигнет верхнего края пластины. После этого пластину необходимо высушить, а верхний загрязненный край срезать на 10—12 мм.

**9.6 Подготовка денситометра к выполнению измерений**

Денситометр включают и подготавливают к работе в соответствии с его описанием и руководством по эксплуатации.

**9.7 Подготовка концентрирующих патронов**

Для подготовки концентрирующего патрона Диапак к работе с него снимают заглушки и пропускают через него с помощью инъекционного шприца одноразового применения последовательно по 5 $см^3$ ацетонитрила и воды. Заглушают оба конца патрона. Подготовленный таким образом патрон может храниться в течение суток при температуре не выше 20 °С.

## 10 Проведение испытаний

**10.1 Нанесение анализируемой пробы на хроматографическую пластину**

Подготовленные по 9.1 элюат анализируемой пробы и градуировочные растворы, приготовленные по 9.3, наносят на хроматографическую пластину, подготовленную по 9.5.

В отсутствие механического или автоматического дозатора на пластину на расстоянии 10 мм от нижнего края графитовым карандашом наносят тонкую стартовую линию, на которую через каждые 10 мм в порядке слева направо наносят микрошприцем М-10Н аликвоты 5 $мм^3$ элюата анализируемой пробы и градуировочных растворов с диаметром точки нанесения не более 4 мм. Не следует наносить элюат анализируемой пробы в точки, расположенные ближе 10 мм от края пластины.

**10.2 Хроматографическое разделение**

Хроматографическую пластину с нанесенной пробой и градуировочным раствором по 10.1 помещают нижним краем на дно хроматографической камеры, подготовленной по 9.4, и закрывают крышку камеры. Движение элюента по пластине вверх приводит к хроматографическому разделению компонентов пробы и градуировочного раствора. Хроматографирование заканчивают по достижении расстояния между стартовой линией и центром пятна не более 70—80 мм.

Пластину вынимают из камеры и сушат на воздухе в вытяжном шкафу в течение 5 мин при комнатной температуре.

В результате хроматографирования должны быть получены пятна с четкой границей диаметром не более 4 мм, для чего следует применять дробное нанесение элюата анализируемой пробы микрошприцем М-10Н с помощью аппликатора и подсушку нанесенных проб с применением нагревательного устройства УСП-1М.

**10.3 Экспонирование и обработка изображения хроматограмм**

После проведения процедур по 10.2 пластину помещают в осветительную камеру денситометра и освещают лучом света в УФ диапазоне при длине волны 365 нм. Регистрируют изображение хроматограммы в виде сигналов флюоресценции проявленных пятен охратоксина А.

## 11 Обработка и оформление результатов измерений

**11.1 Подтверждение наличия охратоксина А**

Идентификацию охратоксина А проводят по $R_f$ определяемого вещества, где $R_f$ — расстояние от линии старта до центра пятна по 10.2.

Надежной идентификации охратоксина А соответствует совпадение его значения $R_f$ и $R_f$ градуировочного раствора при максимальной разности между ними не более 2 мм.

**11.2 Количественное определение содержания охратоксина А**

Количественное определение охратоксина А в исследуемой пробе вина или виноматериала проводят методом сканирующей денситометрии в результате сравнения пятен охратоксина А пробы и градуировочного раствора по разделу 10.

Массовую концентрацию охратоксина А $X$ в вине и виноматериалах, $мкг/см^3$, вычисляют с использованием программы оценки и расчета параметров хроматограмм по формуле

$$X = \frac{M_{вых} \cdot V_1}{V_2 \cdot V}, \qquad (2)$$

где $M_{вых}$ — масса охратоксина А в проявленном пятне пластины ТСХ, нг;

$V_1$ — объем ацетонитрила, используемого для десорбции охратоксина А, полученного по 9.1, $см^3$;

$V_2$ — объем анализируемого раствора охратоксина А пробы, нанесенного на пластину ТСХ по 10.1, мм³;

$V$ — объем пробы анализируемого вина или виноматериала, взятой для анализа, равный 10 см³.

За окончательный результат определения принимают среднеарифметическое значение двух параллельных определений массовой концентрации охратоксина А, полученных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{X_1 - X_2}{X_{ср}} \cdot 100 \le r, \qquad (3)$$

где $X_1, X_2$ — результаты двух параллельных измерений массовой концентрации охратоксина А в пробе, кг/см³;

$X_{ср}$ — среднее значение двух параллельных измерений массовой концентрации охратоксина А в пробе, мкг/см³;

$r$ — значение предела повторяемости (см. таблицу 1), %.

Результат анализа представляют в виде: ($X_{ср} \pm \Delta$), при $P = 0,95$, мкг/см³,

где $X_{ср}$ — среднеарифметическое значение двух определений массовой концентрации охратоксина А в пробе, признанных приемлемыми, мкг/см³;

$\Delta$ — границы абсолютной погрешности определения, мкг/см³, при доверительной вероятности $P = 0,95$.

Границы абсолютной погрешности $\Delta$ вычисляют по формуле

$$\Delta = \frac{\delta \cdot X}{100}, \qquad (4)$$

где $\delta$ — границы относительной погрешности измерения (см. таблицу 1), %;

$X$ — массовая концентрация охратоксина А в вине или виноматериале, мкг/см³;

100 — коэффициент пересчета абсолютной погрешности, мкг/см³.

Числовое значение результата определения должно оканчиваться цифрой того же разряда, что и значение границы абсолютной погрешности.

## Библиография

[1] Государственный реестр средств измерений, № 23965-02 — Тип приборов для тонкослойной хроматографии с денситометром «Сорбфил»

УДК 663.2.001.4:006.354 ОКС 67.160.10 Н79 ОКСТУ 9108

Ключевые слова: вина и виноматериалы, охратоксин А, метод тонкослойной хроматографии, хроматограммы, хроматографические пластины, обработка результатов

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Т.И. Кононенко*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 08.04.2008. Подписано в печать 28.04.2008. Формат 60 × 84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал. Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 0,85. Тираж 483 экз. Зак. 407.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru