ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53097— 2008 (ИСО 6870:2002)

КОРМА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Определение содержания зеараленона

ISO 6870:2002
Animal feeding stuffs — Qualitative determination of zearalenone (MOD)

Издание официальное

Б З 1—2009/613

Москва
Стандартинформ
2009

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 ПОДГОТОВЛЕН ОАО «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО «ВНИИС») на основе русской версии стандарта, указанного в пункте 4

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 18 декабря 2008 г. № 504-ст

4 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ИСО 6870:2002 «Корма для животных. Качественный метод определения зеараленона» (ISO 6870:2002 «Animal feeding stuffs. Qualitative determination of zearalenone»).

При этом измененные и дополнительные слова, фразы, абзацы, включенные в текст стандарта для учета потребностей национальной экономики Российской Федерации и особенностей российской национальной стандартизации, выделены курсивом

5 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, 2009

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 *Сущность* метода . . . 1
4 *Реактивы* . . . 2
5 Оборудование . . . 2
6 Отбор проб . . . 3
7 *Методика испытания* . . . 3
8 Обработка результатов . . . 5
9 Прецизионность . . . 6
10 Протокол испытаний . . . 6
Приложение А (справочное) Результаты межлабораторных испытаний . . . 7
Библиография . . . 7

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КОРМА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Определение содержания зеараленона

Animal feeding stuffs. Determination of zearalenone

Дата введения — 2010—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает качественный метод определения зеараленона в кормах для животных, в частности, в кукурузе. Данный метод используется только для целей скрининга.

Предел определения зеараленона *не более* 50 мкг/кг.

Примечание — Несмотря на то, что сорго дает мешающие флуоресцирующие пятна, идентичные пятнам зеараленона, данный метод тем не менее применяется для данного корма, потому что значения R_f различны после проявления хроматограммы во втором направлении. Флуоресцирующие пятна не проявляются в случае использования установленного метода подтверждения.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО 52501—2005(ИСО 52501:2005) Вода для лабораторного анализа. Технические условия

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4197—74 Реактивы. Натрий азотистокислый. Технические условия

ГОСТ 9293—74 (ИСО 2435—73) Азот газообразный и жидкий. Технические условия

ГОСТ 12433—83 Изооктаны эталонные. Технические условия

ГОСТ 20015—88 Хлороформ. Технические условия

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 *Сущность* метода

Испытуемую пробу корма экстрагируют смесью ацетонитрила и раствором хлорида калия, затем фильтруют и обезжиривают изооктаном, после чего производят очистку в смеси ацетонитрила, воды и ацетата свинца в присутствии диатомовой земли. После фильтрации пробу экстрагируют хлороформом, который затем выпаривают.

Издание официальное

Сухой экстракт растворяют в смеси бензола и ацетонитрила. Осуществляют двумерную тонкослойную хроматографию *испытуемой* пробы. Содержание зеараленона определяют визуальным измерением или измерением интенсивности флуоресценции пятна в УФ-свете путем сравнения с известными количествами зеараленона, нанесенными на ту же пластинку.

Идентичность зеараленона подтверждают с помощью *раствора* бис-диазотированного бензидина.

4 *Реактивы*

При испытании используют только реактивы аналитической чистоты и дистиллированную или деминерализованную воду либо воду эквивалентной чистоты по *ГОСТ Р ИСО 52501*.

4.1 Ацетонитрил *для хроматографии*.

4.2 Изооктан по *ГОСТ 12433*.

4.3 Хлороформ *по ГОСТ 20015*.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ! Хлороформ — токсичное вещество. Необходимо избегать вдыхания или воздействия хлороформа. При работе с ним или его растворами необходимо использовать вытяжной шкаф.

4.4 Бензол/ацетонитрил, смесь 98:2, по объему.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ! Бензол токсичен при вдыхании и контакте с кожей, а также легко воспламеняется.

4.5 Элюенты

4.5.1 Толуол/этилацетат/муравьиная кислота, смесь 6:3:1, по объему.

4.5.2 Хлороформ/этанол, смесь 95:5, по объему.

4.6 Хлорид калия, раствор *массовой* концентрации 40 г/*дм*^{3}.

4.7 Раствор ацетата свинца, приготовленный следующим образом: 200 г ацетата свинца помещают в мерную колбу вместимостью 1000 *см*^{3} с одной меткой, добавляют 3 *см*^{3} уксусной кислоты по *ГОСТ 61*, доливают воду до метки и перемешивают.

4.8 Реагент бис-диазотированный бензидин

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ! Бензидин — канцероген и токсичен при вдыхании, контакте с кожей и попадании внутрь организма.

4.8.1 Приготовление раствора бензидина концентрацией 5 г/*дм*^{3}

0,5 г бензидина помещают в колбу вместимостью 100 *см*^{3}, содержащую 20 *см*^{3} воды и 1,5 *см*^{3} соляной кислоты *по ГОСТ 3118, добиваются растворения бензидина* и доливают воду до метки.

Раствор хранят в темноте в склянках из коричневого стекла.

4.8.2 Приготовление *раствора бензидина*

Равные объемы раствора бензидина (см. 4.8.1) и раствора нитрита натрия *(натрий азотистокислый по ГОСТ 4197)* концентрацией 100 г/*дм*^{3} охлаждают до температуры от 0 °С до 5 °С.

Растворы тщательно смешивают. Полученный раствор становится темно-фиолетовым и мутнеет. Раствор оставляют, чтобы до использования он достиг комнатной температуры (желтого цвета).

Реагент готовят непосредственно перед использованием.

4.9 Диатомовая земля (Целит 545), промытая соляной кислотой.

4.10 Азот *газообразный по ГОСТ 9293*

4.11 Зеараленон, стандартный раствор *массовой* концентрации 10 мкг/*см*^{3}, в бензоле.

Спектр поглощения раствора регистрируют между 300 и 330 нм на спектрометре при использовании кварцевых оптических кювет толщиной 10 мм относительно бензола. Фиксируют максимальную оптическую плотность *A*, которая наблюдается вблизи 317 нм.

Рассчитывают концентрацию зеараленона, в микрограммах на миллилитр раствора, по формуле

$$K = \frac{318A \cdot 1000}{6060}, \qquad (1)$$

где 318 — молярная масса зеараленона;

A — максимальная оптическая плотность;

6060 — молярный коэффициент поглощения.

5 Оборудование

Для испытаний используют следующее лабораторное оборудование:

5.1 Мельница, пригодная для приготовления продукта, который полностью просеивается через сито с размером отверстий 1 мм.

5.2 Аппарат для встряхивания (шейкер), способный производить около 100 встряхиваний в минуту.

5.3 Фильтровальная бумага с порами среднего размера *(«белая лента»)*. Фильтровальная бумага быстрой фильтрации *(«красная лента»)* даст мутный раствор; фильтровальная бумага медленной фильтрации *(«синяя лента»)* будет закупорена.

5.4 Роторный испаритель с круглодонной колбой.

5.5 Оборудование для тонкослойной хроматографии, нанесения пятен (капиллярные пипетки или микрошприцы), проявительная камера и оборудование для распыления реагента на пластинках.

5.6 Стеклянные пластинки для тонкослойной хроматографии, размером 200 × 200 мм, которые готовят, как указано ниже (указанные количества достаточны для приготовления пяти пластинок).

30 г силикагеля G-HR взвешивают в конической колбе, добавляют 60 $см^3$ воды, закрывают пробкой и тщательно перемешивают в течение 1 мин. Суспензию разливают по пластинкам таким образом, чтобы образовался равномерный слой толщиной 0,25 мм. Пластинкам дают высохнуть на воздухе и помещают их в эксикатор. Пластинки активируют перед использованием, помещая их на 1 час в сушильный шкаф, в котором поддерживается температура 110 °С ± 3 °С.

Если получаемые результаты сопоставимы с результатами, получаемыми при использовании пластинок, приготовленных по методу, изложенному в предыдущем абзаце, можно использовать пластинки, которые имеются в продаже.

5.7 Коротковолновая УФ-лампа (длина волны 253 нм).

Интенсивность излучения должна быть такой, чтобы можно было четко различить пятно, содержащее 25 нг зеараленона на тонкослойной пластинке, когда лампа размещена на расстоянии 100 мм от пластинки.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ! В связи с опасностью УФ-излучения для глаз, необходимо использовать средства защиты глаз.

5.8 Пробирки, *вместимостью* 10 $см^3$, с полиэтиленовыми пробками.

5.9 Флуороденситометр (его использование необязательно, но желательно).

5.10 Водяная баня, поддерживающая температуру *(60 ± 1) °С*.

5.11 Коническая колба, *вместимостью* 500 $см^3$, с пришлифованной стеклянной пробкой.

5.12 Делительные воронки, *вместимостью* 250 $см^3$.

5.13 Мерные цилиндры, *вместимостью* 100 и 250 $см^3$.

5.14 Пипетки, *вместимостью* 50 и 100 $см^3$.

5.15 Микрошприцы.

6 *Отбор проб*

Лабораторную пробу продукции *отбирают* для испытаний его в соответствии со стандартом, распространяющимся на данную продукцию, за исключением тех случаев, когда отбор образцов для определения зеараленона исключен из области его применения.

7 *Методика испытания*

7.1 Приготовление *пробы для испытаний*

Образец измельчают так, чтобы он полностью просеивался через сито с размером отверстий 1 мм. Тщательно перемешивают.

7.2 Испытуемая проба

50 г *образца для испытаний* взвешивают с точностью до 0,01 г в конической колбе вместимостью 500 $см^3$.

7.3 Экстракция

В коническую колбу с образцом добавляют 180 $см^3$ ацетонитрила и 20 $см^3$ раствора хлорида калия, тщательно отмеренных в мерном цилиндре. Колбу закрывают пробкой, перемешивают и подвергают встряхиванию во встряхивающем аппарате в течение 30 мин.

Полученный раствор фильтруют через фильтровальную бумагу.

100 $см^3$ фильтрата при помощи пипетки переносят в делительную воронку (см. 5.12) и обезжиривают, проводя две последовательные экстракции порциями по 50 $см^3$ изооктана каждая.

Фазу ацетонитрила собирают в круглодонной колбе роторного испарителя и выпаривают до сухого остатка при пониженном давлении.

7.4 Очистка

К полученному остатку добавляют 20 *см*^{3} ацетонитрила, 60 *см*^{3} воды и 20 *см*^{3} раствора ацетата свинца, тщательно отмеренного в мерном цилиндре. Перемешивают и выдерживают в течение 10 мин на водяной бане, температур у которой поддерживают на уровне 60 °С. Образуется осадок. Добавляют 5 г диатомовой земли и фильтруют через фильтровальную бумагу.

50 *см*^{3} фильтрата при помощи пипетки переносят в делительную воронку и проводят три последовательные экстракции, используя при каждой 50 *см*^{3} хлороформа. Хлороформные фракции высушивают при помощи сульфата натрия. Далее высушенные хлороформные фракции собирают в круглодонной колбе роторного испарителя и испаряют практически до сухого остатка при пониженном давлении.

Остаток количественно переносят в пробирку, промывая хлороформом, затем испаряют до сухого состояния в атмосфере азота на водяной бане.

Микрошприцом осторожно добавляют 0,5 *см*^{3} смеси бензол/ацетонитрил (см. 4.4) и плотно закрывают пробирку.

7.5 Двумерная тонкослойная хроматография

7.5.1 Нанесение растворов (см. рисунок 1)

На пластинке чертят две прямые линии, параллельные прилежащим сторонам (на расстоянии 50 и 60 мм, соответственно, от края), чтобы обозначить предел перемещения фронта растворителя. При помощи микрошприцов на пластинку наносят следующие растворы:

- в точку А — 25 мкл очищенного экстракта;
- в точку В — 10 мкл стандартного раствора;
- в точку С — 5 мкл стандартного раствора;
- в точку D — 10 мкл стандартного раствора;
- в точку Е — 15 мкл стандартного раствора.

Пластинки высушивают в потоке воздуха или азота. Диаметр образующихся пятен *не должен превышать 5 мм*.

7.5.2 Проявление (*элюирование*) (см. рисунок 1)

Проводят элюирование в направлении I, используя *элюент* (слой 10 мм в насыщенной камере, защищенной от света), пока фронт растворителя не достигнет обозначенной линии. Пластинку удаляют из *камеры* и дают ей высохнуть *в течение* 15 мин при комнатной температуре, предохраняя ее от действия света.

После *элюирования* в направлении I может быть полезным краткий просмотр хроматограммы под ультрафиолетовым излучением с длиной волны 253 нм и обозначение контуров возможных пятен зеараленона слегка карандашом (пятно в точке В показывает расположение зеараленона).

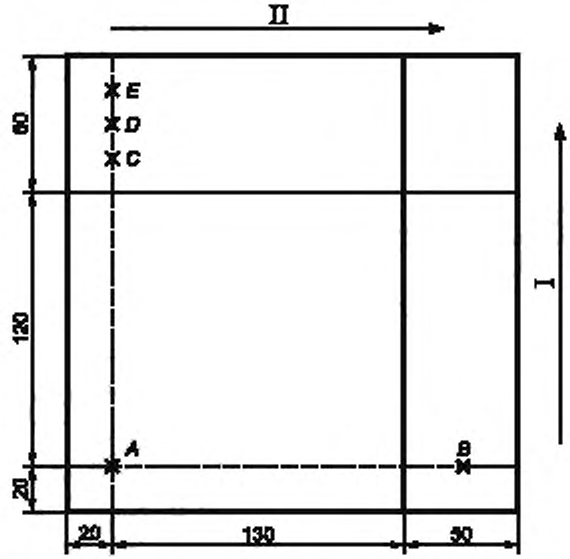


Рисунок 1 — Применение растворов и проявление хроматограммы

Далее *проводят элюирование* в направлении II, используя *элюент* (слой 10 мм в ненасыщенной *камере*, защищенной от света), пока фронт растворителя не достигнет обозначенной линии. Пластинку удаляют из *камеры* и дают ей высохнуть при комнатной температуре, предохраняя ее от действия света.

7.6 *Оценка содержания зеаралинона*

7.6.1 Общие замечания

Для определения присутствия зеараленона можно использовать два метода: визуальную *оценку интенсивности флуоресценции пятна* и флуороденситометрическое измерение. При наличии надлежащего оборудования последний метод является предпочтительным.

7.6.2 Визуальная *оценка*

Содержание зеараленона в образце определяют путем сравнения интенсивности флуоресценции под УФ-излучением пятна экстракта с интенсивностью *пятен* C, D и E стандартного раствора, при размещении пластинки на расстоянии 10 см от УФ-лампы. При необходимости проводят интерполяцию.

Если интенсивность флуоресценции 25 мкл экстракта больше, чем 15 мкл стандартного раствора, используют меньший объем *раствора* в точке A или разбавляют экстракт смесью бензол/ацетонитрил) и проводят повторную тонкослойную хроматографию.

7.6.3 Флуороденситометрическое измерение

Интенсивность флуоресценции пятен измеряют с помощью флуороденситометра при длине волны возбуждения 313 нм и длине волны излучения 443 нм (максимальное излучение при 470 нм).

Содержание зеараленона в образце определяют путем сравнения интенсивности флуоресценции пятна экстракта с интенсивностями пятен C, D и E стандартного раствора.

7.7 Испытание на подтверждение наличия зеараленона

На пластинку распыляют реагент бис-диазотированный бензидин. Зеараленон образует яркое кирпично-красное пятно при комнатной температуре, которое исчезает при выдержке на воздухе в течение 15 мин.

8 Обработка результатов

8.1 Визуальное измерение

Содержание зеараленона B, выраженное в микрограммах на килограмм продукции, рассчитывают по формуле:

$$B = \frac{cV_1V_3}{mV_2}, \qquad (2)$$

где c — *массовая* концентрация зеараленона, в микрограммах на миллилитр стандартного раствора;

m — масса испытуемой пробы, соответствующей объему экстракта, который проходит очистку (12,5 г), г;

V_1 — конечный объем экстракта *с учетом возможных разбавлений*, в микролитрах;

V_2 и V_3 — объемы экстракта и стандартного раствора зеараленона соответственно, наносимые на пластинку, которые показывают аналогичную интенсивность флуоресценции, в микролитрах.

8.2 Флуороденситометрическое измерение

Содержание зеараленона B_1, выраженное в микрограммах на килограмм продукции, рассчитывают по формуле

$$B_1 = \frac{m_1V_1}{mV_2}, \qquad (3)$$

где m — масса испытуемой пробы, соответствующей объему экстракта, который проходит очистку (12,5 г), г;

m_1 — масса зеараленона в пятне экстракта (принимая во внимание объем V_2), установленная на основе определений, в нанограммах;

V_1 — конечный объем экстракта, в микролитрах;

V_2 — объем экстракта, наносимого на пластинку, в микролитрах.

9 Прецизионность

Подробности межлабораторных испытаний *прецизионности* данного метода приведены в приложении А. Значения, полученные на основе межлабораторных испытаний, могут быть неприменимы к диапазонам концентраций и матрицам, отличным от тех, которые приведены.

10 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать:

- информацию, необходимую для полной идентификации *пробы*;
- применяемый метод отбора *проб*, если он известен;
- *используемый метод испытаний* со ссылкой на данный стандарт;
- используемый метод определения (визуальный или флуороденситометрический);
- подробные данные проведения работ, не установленные в данном стандарте или рассматриваемые как необязательные, а также все факторы, влияющие на результат(ы) испытаний;
- полученный результат(ы) испытаний.

Приложение А
(справочное)

Результаты межлабораторных испытаний

Международное межлабораторное испытание с участием 20 лабораторий (только 16 из которых предоставили пригодные результаты для кукурузы В), каждая из которых провела три определения, дает следующие статистические результаты (оцененные в соответствии с [1]), приведенные в таблице А.1.

Таблица А.1 — Результаты межлабораторного испытания

Образец	Кукуруза А	Кукуруза В (кукуруза А, разбавленная на 1/3 кукурузой без зеараленона)
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	20	15
Среднее значение, мкг/кг	734	219
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/кг	78	34
Коэффициент вариации повторяемости, %	11	15
Предел повторяемости r (2,83 s_r), мкг/кг	221	96
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/кг	282	125
Коэффициент вариации воспроизводимости, %	38	57
Предел воспроизводимости R (2,83 s_R), мкг/кг	798	354

Библиография

[1] ИСО 5725-4:2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерения. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерений

УДК 637.544:006.354 ОКС 67.060, 67.080.10 С19 ОКСТУ 9209

Ключевые слова: корма для животных, зеараленон, зерновые культуры, метод испытания, тонкослойная хроматография, УФ-излучение, элюирование, флуороденситометрическое измерение

Редактор *Н.О. Грач*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 27.05.2009. Подписано в печать 15.09.2009. Формат 60 × 84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал. Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 0,80. Тираж 171 экз. Зак. 637.

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