ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53149— 2008

РЫБА, МОРСКИЕ БЕСПОЗВОНОЧНЫЕ И ПРОДУКТЫ ИХ ПЕРЕРАБОТКИ

Количественное определение содержания биогенных аминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное

БЗ 1—2009/628

Москва
Стандартинформ
2010

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 ФГУП «Атлантический научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» (ФГУП «Атлант НИРО»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом 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. № 587-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, 2010

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 Термины и определения 2
4 Сущность метода 2
5 Реактивы 2
6 Средства измерений и оборудование 3
7 Проведение испытаний 3
8 Обработка результатов испытаний 5
9 Требования к точности результатов испытаний 6
10 Протокол испытаний 6
Библиография 7

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РЫБА, МОРСКИЕ БЕСПОЗВОНОЧНЫЕ И ПРОДУКТЫ ИХ ПЕРЕРАБОТКИ

Количественное определение содержания биогенных аминов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Fish, marine invertebrates and products of their processing.
Quantitative determination of biogenic amines content by HPLC method

Дата введения — 2010—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на рыбу, морские беспозвоночные и продукты их переработки и устанавливает метод определения содержания биогенных аминов (БА) (гистамина, кадаверина, путресцина, тирамина, спермина и спермидина) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и измерения

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 ИСО 5725-6—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 199—78 Реактивы. Натрий уксуснокислый 3-водный. Технические условия

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная, цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2603—79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4166—76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4201—79 Реактивы. Натрий углекислый кислый. Технические условия

ГОСТ 4204—77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 6995—77 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

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

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 22300—76 Реактивы. Эфиры этиловый и бутиловый уксусной кислоты. Технические условия

ГОСТ 24104—2001 Весы лабораторные. Общие технические требования

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

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 29228—91 (ИСО 835-2—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 2. Пипетки градуированные без установленного времени ожидания

Издание официальное

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 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **дериватизация:** Получение производных аминов с 5-диметиламино-нафталинсульфонил хлоридом (дансил-хлоридом, ДНС-хлоридом), обладающих флуоресценцией.

3.2 **ДНС-производные:** Соединения, полученные в результате химической реакции аминов с 5-диметиламино-нафталинсульфонил хлоридом (дансил-хлоридом, ДНС-хлоридом).

4 Сущность метода

Сущность метода заключается в экстракции биогенных аминов разбавленным раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ) из гомогенизированной пробы, очистке экстракта на ионообменной смоле Amberlite-CG50, предколоночной дериватизации аминов для получения интенсивно флуоресцирующих производных с последующим количественным определением выделенных аминов высокоэффективной жидкостной хроматографией.

Предел обнаружения аминов в анализируемых продуктах от 5 до 50 мг/кг.

5 Реактивы

Азот газообразный и жидкий по ГОСТ 9293.

Ацетонитрил для ВЭЖХ, ос. ч. (например, предприятия «Криохром», сорт 0-2).

Ацетон по ГОСТ 2603, ч. д. а.

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Волокнистый кварцевый материал (кварцевая вата) СКВ по [1].

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч.

Натрий сернокислый, безводный, по ГОСТ 4166, ч. д. а.

Кислота трихлоруксусная по [2], х. ч.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, стандарт-титр 0,1н.

Кислота уксусная, х. ч. по ГОСТ 61.

Кислота перхлорная, по нормативным документам.

Кислота серная по ГОСТ 4204, х. ч.

Натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201, х. ч.

Натрий уксуснокислый по ГОСТ 199, х. ч.

Натрий сернокислый безводный, по ГОСТ 4166, х. ч.

Метанол по ГОСТ 6995, х. ч.

Этилацетат по ГОСТ 22300, ч. д. а.

Бутилметиловый эфир по нормативным документам, х. ч.

5-диметиламино-нафталинсульфонил хлорид (дансил-хлорид) фирмы Merck или аналогичный по нормативным документам.

Фильтры обеззольные ФО-ФС-15 «синяя лента» по [3].

Фильтры из ПТФЭ, размер пор 0,20 мкм, диаметр 13 мм по [4].

Сорбент Amberlite-CG50, фирмы Sigma или аналогичный по нормативным документам.

Тирамин, кадаверин, путресцин, спермидин, спермин, гистамин или их гидрохлориды массовой долей основного вещества не менее 98 %.

Допускается использование других реактивов и материалов по качеству не ниже указанных в настоящем стандарте.

6 Средства измерений и оборудование

Аппарат для встряхивания проб любой марки.

Баня водяная лабораторная с интервалом температуры нагревания 25 °С—100 °С.

Весы лабораторные общего назначения высокого или специального класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 или 210 г и ценой деления 0,1 мг по ГОСТ 24104.

Испаритель ротационный любой марки.

Колонка хроматографическая для ВЭЖХ, с величиной эффективности не менее 5000 теоретических тарелок по пикам определяемых аминов.

Хроматограф жидкостный любой марки с флуориметрическим детектором (диапазон длин волн возбуждения 300—350 нм, регистрации 500—530 нм).

Насос водоструйный лабораторный по ГОСТ 25336.

Микроизмельчитель тканей любой марки с частотой оборотов не менее 8000 об/мин.

Центрифуга лабораторная.

Иономер универсальный любой марки.

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

Микрошприцы на 100 мкл.

Пипетки 4-1-2 или 5-1-2, 4-2-10 по ГОСТ 29227.

Пипетки 1-1-1, 1-1-2, 2-1-5 по ГОСТ 29228.

Воронка стеклянная ВФО 100-14/23 по ГОСТ 25336.

Колба 50-14/23 по ГОСТ 25336.

Стакан химический В-1-100 или В-1-150 по ГОСТ 25336.

Стаканы для взвешивания (бюксы) по ГОСТ 25336.

Шпатели, стеклянные палочки, стеклянные капилляры.

Допускается применение других средств измерений и оборудования по характеристикам и качеству не ниже указанных в настоящем стандарте.

7 Проведение испытаний

7.1 Подготовка к испытанию

7.1.1 Очистка растворителей

Растворители перед анализом проверяют на наличие примесей, мешающих определению аминов, и, при необходимости, дополнительно очищают и перегоняют общепринятыми методами.

7.1.2 Приготовление исходных растворов

Готовят исходные растворы гистамина, кадаверина, путресцина, тирамина, спермина и спермидина, а также 1,7-диаминогептана (внутреннего стандарта) массовой концентрацией 1 мг/см^3. Для этого навеску 0,100 г индивидуального амина, взвешенную с точностью до третьего знака, количественно переносят в мерную колбу на 100 см^3 и доводят до метки 0,2М раствором соляной кислоты. При использовании гидрохлоридов аминов необходимо пересчитывать массу навески с учетом количества молекул гидрохлорида. Например, масса навесок гидрохлоридов аминов для приготовления 100 см^3 раствора:

гистаминдигидрохлорид — 0,166 г;

путресциндигидрохлорид — 0,183 г;

кадаверидигидрохлорид — 0,171 г;

спермидинтригидрохлорид — 0,175 г;

сперминтетрагидрохлорид — 0,172 г;

тирамингидрохлорид — 0,126 г.

Примечание — Гидрохлориды биогенных аминов должны быть высушены в течение суток в эксикаторе над концентрированной серной кислотой.

7.1.3 Приготовление градуировочных растворов

Градуировочные растворы готовят из стандартных растворов. Для этого в мерные колбы вместимостью 100 см^3 отмеривают по 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 и 10,0 см^3 каждого амина и доводят объем до метки 0,2М раствором соляной кислоты. Получают градуировочные растворы с массовой концентрацией по 0,005, 0,010, 0,025, 0,050 и 0,100 мг/см^3 каждого амина.

7.1.4 Приготовление ацетатного буферного раствора

8,2 г ацетата натрия переносят в мерную колбу на 1000 см³, добавляют 6 см³ уксусной кислоты и доводят до метки дистиллированной водой. Значение pH буферного раствора должно составлять 4,7 ± 0,1. Регулируют pH 1М раствором гидроксида натрия или уксусной кислотой.

7.1.5 Приготовление раствора уксусной кислоты молярной концентрацией 0,02 моль/дм³

1,2 г уксусной кислоты помещают в мерную колбу на 1000 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

7.1.6 Приготовление раствора соляной кислоты молярной концентрацией 0,2 моль/дм³

7,3 г соляной кислоты помещают в мерную колбу на 1000 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

7.1.7 Приготовление раствора 5-диметиламино-нафталинсульфонил-хлорида (дансилхлорида) концентрацией 5 мг/см³

50.0 мг дансилхлорида взвешивают с точностью до десятых долей, помещают в колбу вместимостью 20—25 см³ и добавляют 10 см³ ацетона.

7.1.8 Подготовка колонки с Amberlite CG-50

2,0 г ионообменной смолы Amberlite CG-50 заливают 50 см³ ацетатного буферного раствора по 7.1.4 и выдерживают в течение 24 ч, после чего заполняют колонку и дают стечь элюату таким образом, чтобы над слоем сорбента оставалось не более 3 мм раствора, приливают 50 см³ раствора соляной кислоты молярной концентрацией 0,2 моль/дм³, дают стечь раствору, но не допускают высыхания колонки и приливают 100 см³ буферного раствора.

7.2 Проведение испытания

7.2.1 Выделение биогенных аминов из продукта

Навеску продукта массой 10 г помещают в колбу вместимостью 100 см³, добавляют внутренний стандарт объемом 1 см³ и доводят до метки 10 %-ным раствором трихлоруксусной кислоты. Затем гомогенизируют полученную суспензию в течение 1—2 мин со скоростью не менее 8000 об/мин. Полученную смесь фильтруют через складчатый фильтр.

7.2.2 Очистка фильтрата на колонке с ионообменной смолой Amberlite CG-50

В колбу вместимостью 50 см³ приливают 4 см³ фильтрата по 7.2.1, 0,4 см³ раствора гидроокиси натрия массовой концентрацией 20 % и 30 см³ ацетатного буферного раствора. pH раствора должен быть 4,7 ± 0,1. Подготовленный таким образом раствор осторожно наносят на колонку по 7.1.8. Промывают колонку 30 см³ ацетатного буфера, после чего элюируют амины 0,2М раствором соляной кислоты объемом 20 см³. 5 см³ элюата помещают в круглодонную колбу вместимостью 50 см³ и выпаривают на роторном испарителе досуха при температуре не выше 60 °С.

7.2.3 Получение ДНС-производных выделенных биогенных аминов

К сухому остатку, полученному по 7.2.2, приливают 0,1 см³ насыщенного раствора бикарбоната натрия (pH 8,5—9) и 1 см³ ацетонового раствора ДНС-хлорида с концентрацией 5 мг/см³. Колбу закрывают крышкой, смесь осторожно перемешивают и выдерживают при температуре 55 °С в течение 1 ч в темном месте, периодически помешивая. Затем охлаждают и экстрагируют ДНС-производные бутилметиловым эфиром трижды по 5 см³, объединенный экстракт высушивают, пропуская через фильтр с безводным сульфатом натрия, после чего выпаривают на роторном испарителе при температуре не выше 30 °С. Сухой остаток растворяют в 1 см³ ацетонитрила. Измерения выполняют немедленно, при задержке измерений более чем на 10 мин после процедуры получения анализ повторяют заново.

7.2.4 Приготовление ДНС-производных исходных растворов

Для получения ДНС-производных исходных растворов биогенных аминов 1 см³ каждого стандартного раствора по 7.1.2 выпаривают на роторном испарителе досуха при температуре не выше 60 °С, после чего проводят процедуру дериватизации по 7.2.3.

7.2.5 Приготовление ДНС-производных градуировочных растворов

Для получения градуировочных растворов ДНС-производных биогенных аминов 1 см³ каждого градуировочного раствора по 7.1.3 выпаривают на роторном испарителе досуха при температуре не выше 60 °С, после чего проводят процедуру дериватизации по 7.2.3.

7.2.6 Определение содержания биогенных аминов

7.2.6.1 Условия хроматографирования

Условия проведения хроматографического анализа подбираются в зависимости от вида применяемого жидкостного хроматографа и хроматографической колонки.

Примерные условия хроматографического определения биогенных аминов:

Жидкостной хроматограф Shimadzu LC-2010A с флуоресцентным детектором RF-10A.

Колонка длиной 250 мм и диаметром 4,6 мм с обращенной фазой С18, размер частиц 5 мкм.

Подвижная фаза: ацетонитрил, метанол, 0,02М раствор уксусной кислоты.

Градиент: ацетонитрил — от 30 % до 50 % в течение 30 мин.

Метанол от 30 % до 50 % в течение 30 мин.

0,02М раствор уксусной кислоты — с 40 % до 0 % в течение 30 мин.

Длина волны возбуждающего света 337 нм, эмиссии — 520 нм.

Скорость элюирования: 1 мл/мин.

Объем вводимой пробы: 20 мкл.

7.2.6.2 Градуировка хроматографа

Градуировку хроматографа проводят, используя дериватные градуировочные растворы, приготовленные по 7.2.5 с добавлением внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта используют 1,7-диаминогептан.

В условиях, позволяющих разделить все составные вещества калибровочной смеси (см. 7.2.6.1), записывают не менее трех хроматограмм для каждого раствора.

Определяют среднеарифметическое значение площади пиков каждого амина, рассчитанное из трех хроматограмм.

Отдельно записывают по две хроматограммы для каждого амина для определения времени удерживания, используя дериватные исходные растворы, приготовленные по 7.2.4, объем инжекции 1—2 мкл.

На основании полученных данных проверяют стабильность значений времени удерживания аминов и рассчитывают градуировочные коэффициенты.

Сходимость значений времени удерживания считают удовлетворительной при отклонении значений времени удерживания не более чем на 5 %.

Градуировочный коэффициент K, определяемый экспериментально в зависимости от выбранных условий детектирования по хроматограмме стандартной смеси биогенных аминов, включающей 1,7-диаминогептан, для каждого амина вычисляют по формуле

$$K = \frac{m_n S_2}{m_2 S_n}, \quad (1)$$

где m_n — масса введенного амина, мкг;

S_2 — площадь пика внутреннего стандарта, усл. ед.;

m_2 — масса внутреннего стандарта, мкг;

S_n — площадь пика индивидуального полициклического ароматического углеводорода (ПАУ), усл. ед.

Градуировочный коэффициент K рассчитывают для каждого компонента каждого раствора. Его значения не должны отличаться от среднеарифметического более чем на 10 %.

7.2.6.3 Проведение измерений

Анализируемые растворы хроматографируют дважды в одинаковых условиях.

Определение содержания биогенных аминов проводят методом внутреннего стандарта.

8 Обработка результатов испытаний

На основании полученных данных определяют массовую концентрацию X_n каждого амина, мг/кг, в продукте по формуле

$$X_n = \frac{m_{ст} K (S_1/S_3 - S_2/S_4)}{M}, \quad (2)$$

где $m_{ст}$ — масса внутреннего стандарта, введенного в пробу продукта и пробу контрольного образца, мкг;

K — градуировочный коэффициент, установленный по формуле (1);

S_1 — площадь пика амина на хроматограмме пробы продукта, усл. ед.;

S_2 — площадь пика амина на хроматограмме пробы контрольного образца, усл. ед.;

S_3 — площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме пробы продукта, усл. ед.;

S_4 — площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме пробы контрольного образца, усл. ед.;

M — масса навески, взятая для анализа, г.

Результаты округляют до десятых долей целого числа. За окончательный результат испытания X принимают среднеарифметическое двух параллельных определений X_1 и X_2 с тем же числом значащих цифр.

Результат анализа представляют в виде ($X \pm \Delta$), мг/кг при $P = 0,95$,

где X — среднеарифметическое двух параллельных определений;

Δ — граница интервала, в котором абсолютная погрешность измерений находится с доверительной вероятностью $P = 0.95$.

Характеристику погрешности вычисляют по формуле

$$\Delta = 0,01\delta X, \quad (3)$$

где δ — граница интервала, в котором относительная погрешность измерений находится с доверительной вероятностью $P = 0,95$.

9 Требования к точности результатов испытаний

9.1 Общие положения

Точность (правильность и прецизионность) результатов анализа определяют в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-1, ГОСТ Р ИСО 5725-2, ГОСТ Р ИСО 5725-6.

9.2 Метрологические характеристики

Метод обеспечивает получение результатов измерения с метрологическими характеристиками, не превышающими значений, приведенных в таблице 1.

Таблица 1

Определяемый компонент и диапазон его измерений, мг/кг	Граница интервала, в котором относительная погрешность находится с доверительной вероятностью $P = 0,95$ δ, %	Предел повторяемости r, %	Предел воспроизводимости R, %
Гистамин	19	18	41
Путресцин	18	17	38
Кадаверин	21	20	42
Спермин	28	26	46
Тирамин	26	25	39
Спермидин	22	21	40

10 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать следующую информацию:

всю информацию, необходимую для исчерпывающей идентификации пробы;

метод испытаний и определяемый элемент со ссылкой на настоящий стандарт;

результаты испытаний с указанием единиц измерений;

дату отбора пробы и способ отбора (если он известен),

дату окончания проведения испытаний;

информацию о выполнении требований к повторяемости результатов;

все детали проведения испытаний, не оговоренные в настоящем стандарте или не считающиеся обязательными, а также все инциденты, наблюдавшиеся при проведении испытаний, которые могли повлиять на конечный результат.

Библиография

[1] ТУ 6-11-15-191—81	Волокнистый кварцевый материал (кварцевая вата) СКВ
[2] ТУ 6-09-1926—77	Кислота трихлоруксусная
[3] ТУ 2642-001-42624157—98	Фильтры обеззоленные ФО-ФС-15 «синяя лента»
[4] ТУ 9471-001-00212038—2000	Фильтры из ПТФЭ 4

УДК 664.951.4:006.354 ОКС 67.120.30 Н23 ОКП 92 7110
92 7114

Ключевые слова: количественный анализ, биогенные амины, высокоэффективная жидкостная хроматография

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Е.Д. Дульнева*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Сдано в набор 02.12.2009. Подписано в печать 17.12.2009. Формат 60x84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал. Печать офсетная. Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 0,90. Тираж 253 экз. Зак. 879.

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