МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ EN 15851— 2013

Продукты пищевые

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНА B_1 В ПРОДУКТАХ НА ЗЕРНОВОЙ ОСНОВЕ ДЛЯ ПИТАНИЯ ГРУДНЫХ ДЕТЕЙ И ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и флуориметрическим детектированием

(EN 15851:2010, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО «ВНИИС») при участии специалистов Государственного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт консервной и овощесушильной промышленности» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ «ВНИИКОП» Россельхозакадемии) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии европейского стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (ТК 335)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 28 августа 2013 г. № 58-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 17 октября 2013 г. № 1170-ст межгосударственный стандарт ГОСТ EN 15851—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2014 г.

5 Настоящий стандарт идентичен европейскому стандарту EN 15851:2010 «Продукты пищевые. Определение афлатоксина B_1 в продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и флуориметрическим детектированием» («Foodstuffs — Determination of aflatoxin B_1 in cereal based foods for infants and young children — HPLC method with immunoaffinity column cleanup and fluorescence detection», IDT)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2019 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Стандартинформ, оформление, 2014, 2019

В Российской Федерации 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 . . . 1
5 Аппаратура . . . 4
6 Процедура проведения испытания . . . 5
7 Анализ с помощью ВЭЖХ . . . 6
8 Обработка результатов . . . 8
9 Презиционность . . . 8
10 Протокол испытаний . . . 9
Приложение А (справочное) Пример типичной хроматограммы . . . 10
Приложение В (справочное) Данные по прецизионности метода . . . 11
Библиография . . . 12

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

Продукты пищевые

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АФЛАТОКСИНА B_1 В ПРОДУКТАХ НА ЗЕРНОВОЙ ОСНОВЕ ДЛЯ ПИТАНИЯ ГРУДНЫХ ДЕТЕЙ И ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и флуориметрическим детектированием

Foodstuffs. Determination of aflatoxin B_1 in cereal based foods for infants and young children. HPLC method with immunoaffinity column cleanup and fluorescence detection

Дата введения — 2014—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения афлатоксина B_1 в продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением очистки экстракта на колонке с иммуноаффинным сорбентом и флуориметрическим детектированием. Метод прошел валидацию путем межлабораторных испытаний проб, загрязненных афлатоксином B_1 естественным и искусственным образом, в диапазоне содержания от 0,07 до 0,18 мкг/кг. Подробная информация о валидации метода приведена в разделе 9 и приложении В.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения).

EN ISO 3696:1995, Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (ISO 3696:1987) (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

3 Сущность метода

Анализируемую пробу экстрагируют смесью метанола и воды. Экстракт фильтруют, разбавляют фосфатно-хлоридным буферным раствором и пропускают через колонку с иммуноаффинным сорбентом, содержащим антитела, специфичные к афлатоксину B_1, при этом происходят очистка экстракта и концентрирование афлатоксина B_1. Афлатоксин B_1 элюируют с колонки метанолом и определяют с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ с применением послеколоночной дериватизации методом бромирования и детектированием по флуоресценции.

Послеколоночную дериватизацию осуществляют с использованием брома, полученного электрохимическим путем или с помощью бромида-пербромида пиридиния.

4 Реактивы

4.1 Общие положения

Для проведения анализа при отсутствии особо оговоренных условий используют только реактивы гарантированной аналитической чистоты и воду не ниже первой степени чистоты по EN ISO 3696:1995.

Издание официальное

Используемые растворители по степени чистоты должны быть пригодны для применения в анализе с помощью ВЭЖХ. Допускается использование готовых растворов, доступных для приобретения, при условии что их характеристики не отличаются от приведенных ниже.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Утилизацию отработанных растворителей проводят в соответствии с требованиями законодательства по охране окружающей среды. Способы обезвреживания отработанных реактивов приведены в материалах Международного агентства по исследованию рака (*IARC*) [1].

4.2 Гелий газообразный очищенный сжатый.

4.3 Азот.

4.4 Натрий фосфорнокислый двухзамещенный безводный (Na_2HPO_4) или гидратированный ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$).

4.5 Калий бромистый.

4.6 Калий хлористый.

4.7 Калий фосфорнокислый однозамещенный.

4.8 Натрий хлористый.

4.9 Натрия гидроксид.

4.10 Кислота соляная, водный раствор массовой долей $w(HCl) = 37$ %.

4.11 Кислота соляная, раствор молярной концентрации $c(HCl) = 0{,}1$ моль/дм^3

Раствор готовят разбавлением 8,28 см^3 раствора соляной кислоты по 4.10 водой до 1 дм^3.

4.12 Натрия гидроксид, раствор молярной концентрации $c(NaOH) = 0{,}1$ моль/дм^3

Растворяют 4 г гидроксида натрия по 4.9 в 1 дм^3 воды.

4.13 Раствор фосфатно-хлоридный буферный молярной концентрации натрия хлористого $c(NaCl) = 120$ ммоль/дм^3, хлористого калия $c(KCl) = 2{,}7$ ммоль/дм^3, суммы натрия фосфорнокислого и калия фосфорнокислого $c(Na_2HPO_4 + KH_2PO_4) = 10$ ммоль/дм^3, pH = 7,4

Растворяют 8,0 г натрия хлористого по 4.8, 1,2 г безводного двухзамещенного фосфорнокислого натрия [или 2,9 г гидратированного двухзамещенного фосфорнокислого натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)] по 4.4, 0,2 г однозамещенного фосфорнокислого калия по 4.7 и 0,2 г хлористого калия по 4.6 в 900 см^3 воды.

Значение pH приготовленного раствора доводят до 7,4 ед. pH путем добавления раствора соляной кислоты по 4.11 либо раствора гидроксида натрия по 4.12, после чего объем раствора доводят водой до 1 дм^3. В качестве альтернативы допускается использовать доступный для приобретения таблетированный препарат или готовый раствор с аналогичными характеристиками.

4.14 Пиридиния бромид-пербромид (CAS 39416-48-3).

4.15 Ацетонитрил.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Ацетонитрил является токсичным веществом, поэтому все операции по приготовлению растворов, содержащих ацетонитрил, следует проводить в вытяжном шкафу с использованием взрывобезопасного перемешивающего устройства. Фильтрование растворов, содержащих ацетонитрил, следует проводить также в вытяжном шкафу.

4.16 Метанол для ВЭЖХ.

4.17 Метанол технический.

4.18 Толуол.

4.19 Экстрагент

Смешивают восемь объемных частей метанола по 4.17 с двумя объемными частями воды.

4.20 Кислота азотная, раствор молярной концентрации $c(HNO_3) = 4$ моль/дм^3.

4.21 Подвижная фаза А для использования при послеколоночной дериватизации бромидом-пербромидом пиридиния

Смешивают шесть объемных частей воды с двумя объемными частями ацетонитрила по 4.15 и тремя объемными частями метанола по 4.16. Перед использованием подвижную фазу дегазируют, например с помощью гелия, по 4.2.

4.22 Подвижная фаза В для использования при послеколоночной дериватизации бромом, полученным электрохимическим путем

Смешивают шесть объемных частей воды с двумя объемными частями ацетонитрила по 4.15 и тремя объемными частями метанола по 4.16. Добавляют из расчета на 1 дм^3 подвижной фазы по 120 мг бромистого калия по 4.5 и по 350 мм^3 азотной кислоты по 4.20. Перед использованием подвижную фазу дегазируют, например с помощью гелия, по 4.2.

4.23 Реактив для послеколоночной дериватизации

Растворяют 50 мг бромида-пербромида пиридиния по 4.14 в 1 дм^3 воды. Реактив используют в сочетании с подвижной фазой А по 4.21. Срок годности раствора — четыре дня при хранении в темном месте при комнатной температуре.

4.24 Смесь толуола и ацетонитрила

Смешивают девять объемных частей толуола по 4.18 с одной объемной частью ацетонитрила по 4.15.

4.25 Колонка с иммуноаффинным сорбентом

Для проведения испытания пригодна колонка с иммуноаффинным сорбентом с иммобилизованными антителами, специфичными в отношении афлатоксина B_1, имеющая сорбционную емкость по отношению к афлатоксину B_1 не менее 100 нг и обеспечивающая полноту обнаружения не менее 80 % при внесении в нее 5 нг афлатоксина B_1 в растворе, состоящем из 10 объемных частей метанола и 90 объемных частей воды.

4.26 Афлатоксин B_1 кристаллический или в виде ампульного препарата в пленочной форме, либо в виде раствора, доступного для приобретения.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Афлатоксины подвержены фотохимическому разложению. Лабораторное помещение, в котором проводятся испытания, должно быть в достаточной мере защищено от доступа дневного света. Это достигается путем аппликации на окна пленки, поглощающей ультрафиолетовый свет, в сочетании с обеспечением отсутствия доступа прямого солнечного света, либо путем применения занавесей или жалюзи при искусственном освещении, при этом в качестве источников света допустимо использовать люминесцентные лампы.

Растворы афлатоксинов следует всеми возможными мерами защищать от доступа света путем хранения в темном месте в сосудах из темного стекла или обернутых алюминиевой фольгой.

4.27 Афлатоксин B_1, основной раствор массовой концентрации c = 10 мкг/см^3

Готовят основной раствор афлатоксина B_1 массовой концентрации около 10 мкг/см^3 в смеси толуола с ацетонитрилом по 4.24.

Для определения точной массовой концентрации афлатоксина B_1 в основном растворе регистрируют его оптическую плотность в диапазоне длин волн от 330 до 370 нм в кварцевой кювете длиной оптического пути 1 см с использованием спектрофотометра по 5.14. В качестве раствора сравнения используют смесь толуола с ацетонитрилом по 4.24. По полученному спектру определяют длину волны, соответствующую максимальной оптической плотности. Массовую концентрацию афлатоксина B_1, ρ_{afl}, мкг/см^3, рассчитывают по формуле

$$\rho_{afl} = \frac{A_{max} M 100}{\varepsilon b}, \quad (1)$$

где A_{max} — максимальное значение оптической плотности в данном диапазоне длин волн (между 330 и 370 нм);

M — молярная масса афлатоксина B_1, г/моль (M = 312 г/моль);

ε — молярный коэффициент поглощения афлатоксина B_1 в смеси толуола с ацетонитрилом по 4.24, м^2/моль, (ε = 1930 м^2/моль) [2];

b — длина оптического пути кюветы, см.

Основной раствор хранят при температуре около минус 18 °С. Перед использованием раствор выдерживают до достижения комнатной температуры. При указанных условиях хранения срок годности раствора составляет, как правило, 12 мес. При хранении основного раствора более 12 мес перед его использованием проверяют соответствие фактической массовой концентрации афлатоксина B_1 ранее установленному значению.

4.28 Афлатоксин B_1, стандартный раствор массовой концентрации ρ = 5,00 нг/см^3

Пипеткой отбирают порцию основного раствора по 4.27, содержащую точно 1,00 мкг афлатоксина B_1, и помещают ее в мерную колбу вместимостью 200 см^3, объем содержимого в колбе доводят до метки смесью толуола с ацетонитрилом по 4.24. Массовая концентрация афлатоксина B_1 в полученном стандартном растворе составляет 5,00 нг/см^3.

Раствор хранят при температуре не выше минус 4 °С в колбе, плотно обернутой алюминиевой фольгой. Перед использованием алюминиевую фольгу удаляют после достижения раствором комнатной температуры с целью предотвращения попадания конденсата внутрь колбы. При указанных условиях хранения срок годности раствора составляет не менее четырех недель.

4.29 Афлатоксин B_1, раствор массовой концентрации ρ = 2 мкг/см^3 для внесения в пробу при контроле полноты обнаружения

Пипеткой отбирают порцию основного раствора по 4.27, содержащую точно 20 мкг афлатоксина B_1, и помещают ее в мерную колбу вместимостью 10 см^3. Растворитель (смесь толуола с ацетонитрилом) удаляют досуха в токе азота при комнатной температуре, после чего объем содержимого в колбе доводят до метки метанолом по 4.16, содержимое колбы тщательно перемешивают. Массовая концентрация афлатоксина B_1 в полученном растворе составляет 2 мкг/см^3.

Раствор хранят при температуре не выше минус 4 °С в колбе, плотно обернутой алюминиевой фольгой. Перед использованием алюминиевую фольгу удаляют после достижения раствором комнатной температуры с целью предотвращения попадания конденсата внутрь колбы. При указанных условиях хранения срок годности раствора составляет не менее 3 мес.

5 Аппаратура

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Всю стеклянную лабораторную посуду, контактирующую при проведении испытания с водными растворами афлатоксинов, перед использованием ополаскивают раствором кислоты. Данная процедура является составной частью программы работы многих машин для мойки лабораторной посуды. В качестве альтернативы стеклянную посуду, контактирующую с водными растворами афлатоксинов, помещают на длительный срок (например, на 15 ч на ночь) в раствор серной кислоты концентрации 2 моль/дм^3, после чего тщательно (не менее трех раз) ополаскивают водой для полного удаления кислоты. Полноту удаления кислоты контролируют с помощью индикаторной бумаги.

Необходимость данной процедуры обусловлена потерями афлатоксинов при контакте их растворов со стеклянной посудой, не обработанной кислотой. Обработка кислотой необходима в отношении круглодонных колб, мерных колб и цилиндров, стеклянных колб и сосудов для градуировочных растворов и раствора пробы для хроматографического анализа, в особенности для флаконов к автосамплеру, а также для пастеровских пипеток, используемых при отборе градуировочных растворов и экстрактов.

При проведении испытания используют общеупотребительные лабораторные приборы и оборудование, в частности перечисленные ниже.

5.1 Весы аналитические, пригодные для взвешивания с точностью до 0,0001 г.

5.2 Весы лабораторные, пригодные для взвешивания с точностью до 0,01 г.

5.3 Встряхиватель лабораторный вертикального или горизонтального типа с возможностью регулировки скорости встряхивания.

5.4 Фильтры складчатые диаметром, например, 24 см.

5.5 Колбы конические с винтовой крышкой или стеклянной пробкой вместимостью 500 см^3.

5.6 Фильтры из стеклянного микроволокна, задерживающие частицы размером не менее 1,6 мкм, или аналогичные.

5.7 Резервуары вместимостью 75 см^3 с адаптером типа люер-лок в комплекте с приспособлениями для подсоединения иммуноаффинных колонок.

5.8 Насос ручной объемом цилиндра 20 см^3, снабженный адаптером типа люер-лок или резиновой втулкой для соединения с иммуноаффинной колонкой.

5.9 Колбы мерные вместимостью 5, 10, 20, 150 и 200 см^3 точностью не ниже 0,5 %.

5.10 Фильтры мембранные шприцевые размером диаметра пор 0,45 мкм

Перед использованием следует убедиться в отсутствии потерь афлатоксина B_1 при фильтрации путем установления полноты его обнаружения.

Примечание — Некоторые фильтрующие материалы могут задерживать афлатоксин B_1.

5.11 Пипетки вместимостью 2 и 10 $см^3$.

5.12 Микрошприцы или микропипетки градуированные вместимостью от 25 до 500 $мм^3$.

5.13 Система для ВЭЖХ в указанной ниже комплектации

5.13.1 Инжектор, обеспечивающий объем ввода 1000 $мм^3$ (рекомендуется полное заполнение петли).

Объем инжекции может быть меньше указанного при условии обеспечения предела обнаружения афлатоксина B_1 не более 0,05 мкг/кг (при отношении уровня аналитического сигнала к уровню шума, равном 3) и предела количественного определения не более 0,1 мкг/кг. Предел количественного определения устанавливают путем многократных анализов стандартного раствора афлатоксина B_1 массовой концентрации, соответствующей содержанию афлатоксина B_1 в пробе 0,1 мкг/кг. При этом относительное стандартное отклонение аналитического сигнала не должно превышать 10 %. Полученные результаты документируют.

5.13.2 Насос для подачи подвижной фазы, обеспечивающий скорость подачи подвижной фазы 1 $см^3$/мин.

5.13.3 Детектор флуориметрический, снабженный оптическим фильтром для выделения длины волны возбуждения 360 нм и отсекающим оптическим фильтром для выделения диапазона длин волн эмиссии выше 420 нм, или аналогичный детектор, например снабженный монохроматорами.

5.13.4 Самописец, интегратор или компьютерная система обработки данных.

5.13.5 Колонка для ВЭЖХ аналитическая, заполненная обращенно-фазовым сорбентом, например с привитыми октадецильными группами (C_{18} или ODS-2), снабженная соответствующей обращенно-фазовой защитной колонкой.

Для проведения испытания пригодна колонка, обеспечивающая отделение пика афлатоксина B_1 от сопутствующих пиков матрицы пробы. Перекрывание пика афлатоксина B_1 другими пиками не должно превышать 10 % его высоты. При необходимости для достижения требуемой степени разделения пиков проводят корректировку состава подвижной фазы.

5.13.6 Система для послеколоночной дериватизации с использованием бромида-пербромида пиридиния (применяется только с подвижной фазой А по 4.21), состоящая из насоса, обеспечивающего отсутствие пульсаций скорости потока, соединительного элемента для трех капилляров, имеющего нулевой мертвый объем, и реактора в виде капилляра из политетрафторэтилена длиной 45 см и внутренним диаметром 0,5 мм.

5.13.7 Система для послеколоночной дериватизации с использованием брома, полученного электрохимическим путем (применяется только с подвижной фазой В по 4.22), например ячейка KOBRA®[1)].

5.13.8 Дегазатор подвижной фазы (применяется по выбору пользователя).

5.14 Спектрофотометр, пригодный для измерений оптической плотности в ультрафиолетовой области спектра, в комплекте с кварцевыми кюветами.

6 Процедура проведения испытания

6.1 Экстракция

Перед отбором пробы для анализа лабораторную пробу тщательно перемешивают.

50 г пробы для анализа, измеренной с точностью до 0,1 г, помещают коническую колбу вместимостью 500 $см^3$. В колбу добавляют 5 г хлористого натрия по 4.8 и 250 $см^3$ экстрагента по 4.19. Содержимое колбы встряхивают сначала вручную в течение 15—30 с, затем с использованием встряхивателя по 5.3 в течение 30 мин. Полученный экстракт фильтруют через складчатый фильтр по 5.4. Пипеткой по 5.11 отбирают аликвоту фильтрата объемом 10 $см^3$ и переносят ее в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ по 5.9. Объем содержимого в колбе доводят до метки фосфатно-хлоридным буферным раствором по 4.13. Содержимое колбы снова фильтруют через фильтр из стеклянного микроволокна по 5.6. Аликвоту фильтрата объемом от 50 до 100 $см^3$ переносят в резервуар по 5.7, присоединенный к предварительно кондиционированной иммуноаффинной колонке по 4.25. Дальнейшую очистку экстракта на иммуноаффинной колонке проводят в соответствии с 6.2.

[1)] Ячейка KOBRA® — торговое наименование подходящего изделия, доступного для приобретения. Эта информация дана для удобства применения настоящего стандарта и не является рекламной поддержкой данного изделия. Допускается использовать другие изделия с аналогичными техническими характеристиками.

6.2 Очистка экстракта на колонке с иммуноаффинным сорбентом

Очистку экстракта проводят с применением разрежения либо избыточного давления, либо жидкость протекает через колонку под действием собственной силы тяжести. При этом скорость протока не должна превышать предельно допустимой величины для данной колонки. Соблюдение данного требования требует особого внимания при применении разрежения.

Иммуноаффинную колонку по 4.25 подготавливают к использованию в соответствии с инструкцией изготовителя. Если в этой инструкции предписано избегать попадания воздуха в колонку, на соблюдение этого требования обращают особое внимание. Перед кондиционированием колонку выдерживают до достижения ею комнатной температуры.

Аликвоту фильтрованного экстракта пропускают через колонку со скоростью около 3 $см^3$/мин (примерно одна капля в секунду), но не более 5 $см^3$/мин. Далее колонку промывают фосфатно-хлоридным буферным раствором по 4.13 объемом около 15 $см^3$ порциями по 5 $см^3$ при скорости протока не более 5 $см^3$/мин. По окончании промывания колонку высушивают, для чего на выходе из нее создают небольшое разрежение в течение 5—10 с или пропускают через нее воздух с помощью шприца в течение 10 с.

6.3 Приготовление раствора пробы для хроматографического анализа

Афлатоксин B_1 элюируют с колонки, для чего через нее пропускают 0,50 $см^3$ метанола по 4.16 под действием силы тяжести. Элюат собирают в мерную колбу по 5.9 вместимостью 5 $см^3$. Колонку оставляют в покое на 1 мин, после чего через нее пропускают вторую порцию метанола по 4.16 объемом 0,75 $см^3$. Элюирование заканчивают продуванием колонки воздухом с целью сбора максимально возможного количества элюата. Объем содержимого колбы с элюатом доводят до метки водой, содержимое колбы тщательно перемешивают. Если полученный раствор прозрачен, его непосредственно используют для хроматографического анализа. Если раствор непрозрачен, перед хроматографическим анализом его фильтруют через мембранный шприцевой фильтр по 5.10.

Примечание — Для иммуноаффинных колонок различных изготовителей операции пропускания экстракта через колонку, промывки колонки и элюирования несколько различаются, поэтому при их проведении следует руководствоваться прилагаемой к колонке инструкцией по ее использованию.

6.4 Процедура проведения испытания пробы с добавкой афлатоксина B_1

Для контроля полноты обнаружения афлатоксина B_1 проводят испытание пробы с добавкой метанольного раствора афлатоксина B_1 по 4.29. Содержание афлатоксина B_1 в пробе должно находиться в пределах диапазона градуировки, желательно в середине этого диапазона. В пробу пипеткой по 5.11 добавляют не более 2 $см^3$ раствора афлатоксина B_1, после чего пробу выдерживают в темноте в течение 0,5—2 ч для удаления растворителя.

7 Анализ с помощью ВЭЖХ

7.1 Условия хроматографического анализа

Хроматографический анализ афлатоксина B_1 проводят при комнатной температуре с использованием обращенно-фазовой колонки по 5.13.5 и подвижной фазы подходящего состава по 4.21 или 4.22 в изократическом режиме при объеме инжекции 1000 $мм^3$. Для обеспечения максимальной прецизионности рекомендуется полностью заполнять петлю инжектора анализируемым раствором (см. 5.13.1). При использовании колонки внутренним диаметром 4,6 мм рекомендуется устанавливать скорость подачи подвижной фазы 1 $см^3$/мин. Допускается использовать колонки других размеров при условии обеспечения требуемого предела количественного определения, что должно быть подтверждено экспериментально. В этом случае подбирают оптимальную скорость подачи подвижной фазы применительно к размерам колонки.

Время удерживания пика афлатоксина B_1 составляет около 11 мин. Необходимым условием является достижение отделения пика афлатоксина B_1 от пиков других компонентов матрицы пробы на уровне базовой линии. Для достижения максимальной эффективности и степени разделения пиков состав подвижной фазы корректируют добавлением воды, метанола по 4.16 или ацетонитрила по 4.15. Типичная хроматограмма приведена в приложении А.

7.2 Условия послеколоночной дериватизации

При дериватизации бромидом-пербромидом пиридиния используют систему для послеколоночной дериватизации. Дериватизацию проводят при скорости подачи подвижной фазы 1,0 $см^3$/мин и

скорости подачи дериватизирующего реактива 0,30 см^3/мин (значение этого параметра корректируют в зависимости от скорости протока подвижной фазы).

При дериватизации бромом, полученным электрохимическим путем (например, с использованием ячейки KOBRA®), электрохимическую ячейку устанавливают в соответствии с инструкциями изготовителя и проводят дериватизацию при скорости протока подвижной фазы 1,0 см^3/мин и силе тока электролиза 100 мА.

7.3 Приготовление градуировочных растворов

В мерные колбы вместимостью 10 см^3 пипеткой вносят стандартный раствор афлатоксина B_1 по 4.28 в объемах, указанных в таблице 1. Растворитель удаляют досуха в токе азота при комнатной температуре. Далее в колбы вносят по 3,5 см^3 метанола по 4.16 для перерастворения афлатоксина B_1. Объем содержимого в колбах доводят до метки водой, содержимое колб тщательно перемешивают. При соблюдении указанных параметров диапазон массовых концентраций афлатоксина B_1 в градуировочных растворах соответствует диапазону его содержания в пробе от 0,05 мкг/кг до 0,35 мкг/кг.

Примечание — При смешивании метанола с водой имеет место уменьшение объема смеси по отношению к суммарному объему компонентов.

Таблица 1 — Приготовление градуировочных растворов

Градуировочный раствор	Объем стандартного раствора афлатоксина B_1 по 4.28 массовой концентрации 5,00 нг/см^3, взятый для приготовления градуировочного раствора, мм^3	Массовая концентрация афлатоксина B_1 в градуировочном растворе, нг/см^3
1	20	0,01
2	40	0,02
3	60	0,03
4	80	0,04
5	100	0,05
6	120	0,06
7	140	0,07

Для приготовления градуировочных растворов используют пипетки либо другие доступные градуированные стеклянные средства измерения объема.

7.4 Построение градуировочного графика

Градуировку осуществляют в день проведения испытания перед хроматографическим анализом растворов проб, для чего проводят хроматографический анализ градуировочных растворов, приготовленных в соответствии с таблицей 1, при объеме инжекции 1000 мм^3. При построении градуировочного графика в системе координат откладывают значения массовой концентрации афлатоксина B_1 против соответствующих значений площади пика. Полученный график проверяют на соответствие требованиям линейности.

Если содержание афлатоксина B_1 в пробе превышает верхнюю границу диапазона градуировки, проводят новую градуировку, соответствующим образом изменив ее диапазон. В качестве альтернативы анализируемый раствор пробы разбавляют до получения в нем массовой концентрации афлатоксина B_1 в пределах диапазона градуировки.

7.5 Определение афлатоксина B_1 в растворе пробы

Проводят хроматографический анализ растворов проб по 6.3 при тех же условиях, что были использованы при анализе градуировочных растворов.

7.6 Подтверждение правильности идентификации пика афлатоксина B_1

Для подтверждения правильности идентификации пика афлатоксина B_1 выходной конец колонки отсоединяют от системы послеколоночной дериватизации, подсоединяют его непосредственно к флуориметрическому детектору. При отключенной системе послеколоночной дериватизации аналитический сигнал, относящийся к пику афлатоксина B_1, существенно меньше (в десять раз или более).

При использовании электрохимической ячейки данный способ не следует реализовывать, отключив ток электролиза и оставив ячейку подсоединенной к хроматографу, поскольку мембрана ячейки может содержать остаточный бром.

Альтернативным способом идентификации пика афлатоксина B_1 является хроматографический анализ с применением масс-спектрометрического или тандемного масс-спектрометрического детекторов.

8 Обработка результатов

По градуировочному графику определяют массовую концентрацию афлатоксина B_1, нг/см^3, в растворе пробы для анализа.

Содержание афлатоксина B_1 в пробе, w_{afla}, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$w_{afla} = \frac{\rho_{afla} V_1 V_3}{V_2 m_s}, \quad (2)$$

где ρ_{afla} — массовая концентрация афлатоксина B_1 в растворе пробы для хроматографического анализа, определенная по градуировочному графику, нг/см^3;

V_1 — объем экстрагента, использованный для экстракции, см^3 (V_1 = 250 см^3);

V_2 — объем аликвоты неразбавленного экстракта, отобранной для очистки на иммуноаффинной колонке, см^3 [V_2 = (5 – 10) см^3];

V_3 — объем приготовленного раствора пробы для хроматографического анализа, см^3 (V_3 = 5 см^3);

m_s — масса анализируемой пробы, г (m_s = 50 г).

9 Прецизионность

9.1 Общие положения

Подробности межлабораторных испытаний по определению прецизионности метода приведены в таблице В.1 (приложение В). Значения метрологических характеристик, полученные в результате межлабораторных испытаний, могут быть не применимы к другим содержаниям аналита и другим типам матриц, чем те, что указаны в приложении В.

9.2 Повторяемость

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых единичных испытаний, полученными одним методом на идентичном объекте испытаний в одной лаборатории одним оператором с использованием одного оборудования в течение короткого промежутка времени, не должно превышать предел повторяемости r более чем в 5 % случаев.

Значения предела повторяемости для продуктов для питания грудных детей и детей раннего возраста равны:

$\bar{x}$ = 0,10 мкг/кг, r = 0,011 мкг/кг (проба с искусственным внесением афлатоксина B_1);

$\bar{x}$ = 0,18 мкг/кг, r = 0,067 мкг/кг (проба с искусственным внесением афлатоксина B_1);

$\bar{x}$ = 0,07 мкг/кг, r = 0,028 мкг/кг;

$\bar{x}$ = 0,09 мкг/кг, r = 0,020 мкг/кг;

$\bar{x}$ = 0,17 мкг/кг, r = 0,059 мкг/кг.

9.3 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между результатами двух единичных испытаний, полученными одним методом на идентичном объекте испытаний в разных лабораториях разными операторами с использованием разного оборудования, не должно превышать предел воспроизводимости R более чем в 5 % случаев.

Значения предела воспроизводимости для продуктов для питания грудных детей и детей раннего возраста равны:

$\bar{x}$ = 0,10 мкг/кг, R = 0,034 мкг/кг (проба с искусственным внесением афлатоксина B_1);

$\bar{x}$ = 0,18 мкг/кг, R = 0,118 мкг/кг (проба с искусственным внесением афлатоксина B_1);

$\bar{x}$ = 0,07 мкг/кг, R = 0,048 мкг/кг;

$\bar{x}$ = 0,09 мкг/кг, R = 0,022 мкг/кг;

$\bar{x}$ = 0,17 мкг/кг, R = 0,109 мкг/кг.

10 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать как минимум следующие сведения:

a) всю информацию, необходимую для идентификации пробы;

b) ссылку на настоящий стандарт;

c) дату и время отбора пробы (если известны);

d) дату поступления пробы в лабораторию;

e) дату проведения испытания;

f) результаты испытания с указанием единиц измерения;

g) все особенности, наблюдавшиеся при проведении испытания;

h) все операции, не оговоренные в методе или рассматриваемые как необязательные, которые могли повлиять на результат испытания.

Приложение А
(справочное)

Пример типичной хроматограммы

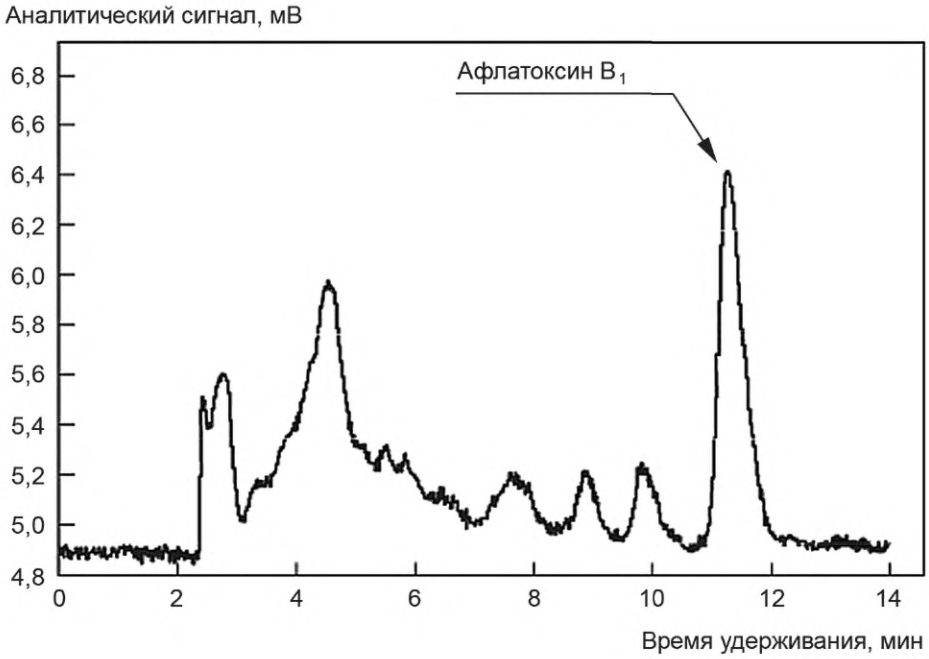

Рисунок А.1 — Пример типичной хроматограммы при определении афлатоксина B_1 в продукте для питания детей раннего возраста с применением очистки экстракта на иммуноаффинной колонке. Содержание афлатоксина B_1 — 0,1 мкг/кг

Условия хроматографического анализа

Колонка: Supelcosil® LC-18[1)] длиной 25 см, размером внутреннего диаметра 4,6 мм.

Скорость протока подвижной фазы — 1 $см^3$/мин.

Состав подвижной фазы — подвижная фаза В по 4.22.

Температура колонки — комнатная.

Объем инжекции — 1000 $мм^3$.

Способ послеколоночной дериватизации — дериватизация бромом, полученным электрохимическим путем.

Условия детектирования — измерение флуоресценции при длине волны возбуждения 365 нм, длине волны эмиссии 435 нм и ширине оптической щели 18 нм.

[1)] Supelcosil® — торговое наименование подходящего изделия, доступного для приобретения. Эта информация дана для удобства применения настоящего стандарта и не является рекламной поддержкой данного изделия. Допускается использовать другие изделия, обеспечивающие аналогичную эффективность хроматографического разделения.

Приложение В
(справочное)

Данные по прецизионности метода

Приведенные в таблице В.1 данные получены в результате межлабораторных испытаний, организованных в рамках Программы по стандартизации, измерениям и испытаниям Европейского сообщества [3] в соответствии с ISO 5725-2 [4], ISO 5725-4 [5] и ISO 5725-6 [6]. Для этих испытаний использованы пробы продуктов для питания грудных детей и детей раннего возраста, загрязненные афлатоксином B_1 как естественным, так и искусственным образом. Предел количественного определения афлатоксина B_1 составлял 0,05 мкг/кг применительно к модели использованного детектора.

Таблица В.1 — Данные по прецизионности метода для продуктов для детского питания

Наименование показателя	Проба				
	1	2	3*	4*	5*
Год проведения испытаний	1999	1999	1999	1999	1999
Количество лабораторий-участников	14	14	14	14	14
Количество параллельных проб	1	1	1	1	1
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	11	14	14	11	13
Количество выбросов (лабораторий)	3	0	0	3	1
Число принятых результатов	11	14	14	11	13
Среднее значение $\overline{x}$, мкг/кг	0,10	0,18	0,07	0,09	0,17
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/кг	0,004	0,024	0,010	0,007	0,021
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	3,5	13	14	8	12
Предел повторяемости r ($r = 2{,}8\ s_r$), мкг/кг	0,011	0,067	0,028	0,020	0,059
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/кг	0,012	0,042	0,017	0,008	0,039
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_r, %	12	23	23	9	23
Предел воспроизводимости R ($R = 2{,}8\ s_R$), мкг/кг	0,034	0,118	0,048	0,022	0,109
Полнота обнаружения, %[a]	101	92	—	—	—
Значение индекса Горвица, рассчитанное по [7]	0,19	0,39	0,34	0,14	0,39
Значение индекса Горвица, рассчитанное по [8]	0,55	1,05	1,01	0,41	1,05
* Проба, загрязненная афлатоксином B_1 естественным образом.					

Библиография

[1] Castegnaro M., Barek J., Fremy J. M., Lafontaine M., Sansone E. B. and Telling G. M. Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes: some mycotoxins. IARC Scientific Publication No. 113, International Agency for Research on Cancer, Lyon (France), 1991, p. 63

[2] Nesheim S., Trucksess M. W., Page S. W. Molar absorptivities of aflatoxins B-1, B-2, G(1), and G(2) in acetonitrile, methanol, and toluene-acetonitrile (9+1) (modification of AOAC official method 971.22): Collaborative study. Journal of AOAC International, 1999, 82 (2), p. 251—258.

[3] Stroka J., Anklam E., Joerissen U., Gilbert J. Immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography using post-column bromination for the determination of aflatoxin B1 in baby food: Collaborative study. Journal of AOAC International, 2001, 84, p. 1116

[4] ISO 5725-2:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method
[Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения]

[5] ISO 5725-4:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method
[Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерения]

[6] ISO 5725-6:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 6: Use in practice of accuracy values
[Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике]

[7] Horwitz W. and Albert R. (2006), The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision, *Journal of AOAC International*, 89, 1095—1109

[8] Thompson M., 2000, Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Analyst*, 125, 385—386

УДК 637:543.6:006.354

МКС 67.050
67.060

Ключевые слова: продукты пищевые, определение афлатоксина B_1, продукты на зерновой основе для питания детей грудного и раннего возраста, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, очистка экстракта на иммуноаффинной колонке, флуориметрическое детектирование

Редактор *Г.Н. Симонова*
Технические редакторы *В.Н. Прусакова, И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.И. Рычкова*
Компьютерная верстка *Д.В. Кардановской*

Сдано в набор 12.11.2019. Подписано в печать 21.11.2019. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,60.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru