МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ EN 14352–
2013

Продукты пищевые

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУМОНИЗИНОВ B_1 И B_2 В ПРОДУКТАХ НА ОСНОВЕ КУКУРУЗЫ

Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта

(EN 14352:2004, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2013

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 – 92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2–2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены».

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО «ВНИИС») при участии специалистов Государственного научного учреждения Всероссийского научно-исследовательского института консервной и овощесушильной промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИКОП Россельхозакадемии) на основе собственного аутентичного перевода на русский язык европейского регионального стандарта, указанного в пункте 4

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

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 57-П от 27 июня 2013 г.)

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
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Российская Федерация	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен европейскому региональному стандарту EN 14352:2004 «Foodstuffs – Determination of fumonisin B_1 and B_2 in maize based foods. HPLC method with immunoaffinity column clean up» (Продукты пищевые. Определение фумонизинов B_1 и B_2 в продуктах на основе кукурузы. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта).

Перевод с английского языка (en)

Официальный экземпляр европейского регионального стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, имеется в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 08.11.2013 № 1515-ст межгосударственный стандарт ГОСТ EN 14352-2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2015 г.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок – в ежемесячно издаваемом информационном указателе «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, 2013

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
2 Нормативные ссылки
3 Сущность метода
4 Реактивы
5 Аппаратура
6 Отбор проб
7 Процедура проведения испытания
8 Обработка результатов
9 Прецизионность
10 Протокол испытаний
Приложение А (справочное) Данные по прецизионности методики
Приложение В (справочное) Типичные хроматограммы
Библиография

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

Продукты пищевые

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУМОНИЗИНОВ B_1 И B_2 В ПРОДУКТАХ НА ОСНОВЕ КУКУРУЗЫ

Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта

Foodstuffs.
Determination of fumonisins B_1 and B_2 in maize based foods.
HPLC method with immunoaffinity column clean up

Дата введения – 2015–07–01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения фумонизинов B_1 и B_2 в пищевых продуктах на основе кукурузы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением очистки экстракта на колонке с иммуноаффинным сорбентом [1], [2], [3].

Метод прошел валидацию путем межлабораторных испытаний, выполненных в соответствии с Руководством AOAC по процедуре проведения межлабораторных испытаний [4] для определения характеристик эффективности метода анализа. Объектами испытаний были пробы кукурузной муки и хлопьев с содержанием фумонизина B_1 в диапазоне от 323 до 1414 мкг/кг и фумонизина B_2 в диапазоне от 90 до 558 мкг/кг.

2 Нормативные ссылки

Приведенные ниже ссылочные нормативные документы являются обязательными для применения настоящего стандарта. Датированные ссылки предполагают возможность использования только указанного издания документа. В случае недатированных ссылок используют последнее издание документа, включая все дополнения.

EN ISO 3696 Water for analytical laboratory use – Specification and test

methods (ISO 3696: 1987) (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

3 Сущность метода

Фумонизины экстрагируют из пробы смесью воды, метанола и ацетонитрила. Экстракт фильтруют и подвергают очистке на колонке с иммуноаффинным сорбентом. Фумонизины элюируют метанолом, элюат выпаривают, сухой остаток перерастворяют в смеси ацетонитрила с водой с добавлением ортофталевого диальдегида и 2-меркаптоэтанола для получения флуоресцирующих производных фумонизинов. Количественное определение фумонизинов проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением аналитической колонки с обращенно-фазовым сорбентом и флуориметрического детектирования.

4 Реактивы

4.1 Общие положения

Для проведения анализа при отсутствии особо оговоренных условий используют только реактивы гарантированной аналитической чистоты и дистиллированную воду или воду не ниже первой степени чистоты по EN ISO 3696. Используемые растворители по степени чистоты должны быть пригодны для применения в анализе с помощью ВЭЖХ.

4.2 Метанол.

4.3 Ацетонитрил.

4.4 Кислота ортофосфорная объемной долей φ (H_3PO_4) = 85 %.

4.5 Ортофталевый диальдегид.

4.6 2-Меркаптоэтанол.

4.7 Натрий фосфорнокислый однозамещенный, раствор концентрации *c* ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) = 0,1 моль/дм^3

Раствор готовят растворением 15,6 г однозамещенного фосфата натрия

($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) в 1 $дм^3$ воды.

4.8 Натрий тетраборнокислый, раствор концентрации $c(Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O) = 0{,}1$ моль/$дм^3$

Раствор готовят растворением 3,8 г тетрабората натрия ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) в 100 $см^3$ воды.

4.9 Натрий хлористый.

4.10 Натрий фосфорнокислый двухзамещенный (Na_2HPO_4).

4.11 Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4).

4.12 Калий хлористый.

4.13 Кислота соляная концентрированная.

4.14 Экстрагент

Экстрагент готовят смешиванием 25 объемных частей ацетонитрила по 4.3, 25 объемных частей метанола по 4.2 и 50 объемных частей воды.

4.15 Смесь водно-ацетонитрильная объемной долей ацетонитрила $\rho(CH_3CN) = 50$ %

Смешивают 50 объемных частей ацетонитрила по 4.3 с 50 объемными частями воды.

4.16 Раствор фосфатно-хлоридный буферный

Растворяют 8,0 г хлористого натрия по 4.9, 1,2 г двухзамещенного фосфорнокислого натрия по 4.10, 0,2 г однозамещенного фосфорнокислого калия по 4.11 и 0,2 г хлористого калия по 4.12 в 990 $см^3$ воды. Значение pH приготовленного раствора доводят до 7,0 ед. pH добавлением соляной кислоты по 4.13, после чего объем раствора доводят водой до 1 $дм^3$. В качестве альтернативы допускается использовать доступные для приобретения таблетированный препарат или готовый раствор.

4.17 Колонка с иммуноаффинным сорбентом

Для проведения испытания пригодна колонка с иммуноаффинным сорбентом, содержащим иммобилизованные антитела, специфичные в отношении фумонизинов B_1 и B_2, имеющая общую сорбционную емкость по отношению к фумонизинам не менее 5 мкг и обеспечивающая полноту обнаружения не ме-

нее 90 % при внесении в нее 5 мкг фумонизинов B_1 и B_2 в смеси метанола или ацетонитрила с фосфатно-хлоридным буферным раствором, при этом объемная доля метанола или ацетонитрила не должна превышать 10 %. Перед использованием колонку выдерживают до достижения ею комнатной температуры.

4.18 Подвижная фаза для ВЭЖХ

Смешивают 77 объемных частей метанола по 4.2 с 23 объемными частями раствора однозамещенного фосфорнокислого натрия по 4.7. Значение pH полученного раствора доводят до 3,35 добавлением ортофосфорной кислоты по 4.4. Подвижную фазу фильтруют через мембранный фильтр по 5.14.

При необходимости проводят корректировку состава подвижной фазы применительно к свойствам аналитической колонки для ВЭЖХ.

4.19 Реактив для дериватизации фумонизинов

Растворяют 40 мг ортофталевого диальдегида по 4.5 в 1 $см^3$ метанола по 4.2. Добавляют 5 $см^3$ раствора тетраборнокислого натрия по 4.8 и 50 $мм^3$ 2-меркаптоэтанола по 4.6, полученный раствор перемешивают.

Срок годности реактива для дериватизации – 1 неделя при хранении при комнатной температуре в темном месте в укупоренном сосуде темного стекла.

4.20 Фумонизины B_1 и B_2, основные растворы

Готовят основные растворы фумонизина B_1 и фумонизина B_2 в водно-ацетонитрильной смеси по 4.15 массовой концентрации 50 $мкг/см^3$. Основные растворы фумонизинов хранят при температуре около 4 °С, при этом срок их годности составляет не менее 6 мес.

4.21 Фумонизины B_1 и B_2, смешанный основной раствор

В мерную колбу вместимостью 5 $см^3$ помещают 1000 $мм^3$ основного раствора фумонизина B_1 и 500 $мм^3$ основного раствора фумонизина B_2. Объем содержимого в колбе доводят до метки водно-ацетонитрильной смесью по 4.15, после чего содержимое колбы тщательно перемешивают. Массовая концентрация фумонизина B_1 в полученном растворе составляет 10 $нг/мм^3$, фумонизина B_2 – 5 $нг/мм^3$. Раствор хранят при температуре 4 °С, при этом

срок его годности составляет не менее 6 мес. Допускается готовить смешанный основной раствор фумонизинов в меньшем объеме.

4.22 Фумонизины B_1 и B_2, смешанные градуировочные растворы

Градуировочные растворы смеси фумонизинов B_1 и B_2 готовят в мерных колбах вместимостью 5 $см^3$ в соответствии с таблицей 1. Объем содержимого в колбах доводят до метки водно-ацетонитрильной смесью по 4.15, содержимое колб тщательно перемешивают. Градуировочные растворы хранят при температуре 4 °С, при этом срок их годности составляет не менее 6 мес. Допускается готовить градуировочные растворы фумонизинов в меньшем объеме.

Таблица 1 – Приготовление градуировочных растворов смеси фумонизинов B_1 и B_2

Раствор	Объем смешанного основного раствора фумонизинов, взятый для приготовления градуировочного раствора, $мм^3$	Объем водно-ацетонитрильной смеси, использованный для приготовления градуировочного раствора, $мм^3$	Массовая концентрация фумонизина B_1 в градуировочном растворе, $нг/мм^3$	Массовая концентрация фумонизина B_2 в градуировочном растворе, $нг/мм^3$
1	50	4950	0,10	0,050
2	125	4875	0,25	0,125
3	500	4500	1,00	0,500
4	1000	4000	2,00	1,000

5 Аппаратура

5.1 Общие положения

При проведении испытания используют общеупотребительные лабораторную посуду и оборудование, в частности, перечисленные ниже.

5.2 Встряхиватель лабораторный орбитальный.

5.3 Пробирки центрифужные вместимостью 250 $см^3$ с винтовыми пробками.

5.4 Центрифуга лабораторная, обеспечивающая центробежное ускоре-

ние 2500*g*.

5.5 Фильтры бумажные диаметром пор от 20 до 25 мкм.

5.6 Фильтры стекловолоконные диаметром пор 11 мкм.

5.7 Резервуары для элюента вместимостью 25 см^3, снабженные адаптерами для соединения с иммуноаффинными колонками.

5.8 Микрошприцы или микропипетки градуированные вместимостью от 25 до 1000 мм^3.

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

5.10 Весы аналитические, пригодные для взвешивания с точностью до 0,1 мг.

5.11 Устройство для вакуумной фильтрации многопозиционное, приспособленное для установки иммуноаффинных колонок (манифолд).

5.12 Устройство перемешивающее (миксер) типа Вортекс.

5.13 Устройство для выпаривания растворителей, снабженное нагревателем, или аналогичное.

5.14 Фильтры мембранные для водных растворов диаметром пор 0,45 мм^3.

5.15 Система для ВЭЖХ в указанной ниже комплектации:

5.15.1 Насос для подачи подвижной фазы изократический, пригодный для создания постоянной скорости потока 1 см^3/мин.

5.15.2 Инжектор, обеспечивающий объем ввода 20 мм^3.

5.15.3 Колонка для ВЭЖХ аналитическая, заполненная обращенно-фазовым сорбентом, например, с привитыми октадецильными группами (ODS), обеспечивающая отделение пиков фумонизинов от сопутствующих пиков на уровне базовой линии, со следующими характеристиками:

материал корпуса – нержавеющая сталь;

длина колонки – 150 мм;

внутренний диаметр колонки – 4,6 мм;

диаметр частиц сорбента – 5 мкм;

защитная колонка, заполненная подходящим обращенно-фазовым сор-

бентом.

5.15.4 Детектор флуориметрический, снабженный проточной кюветой, позволяющий проводить измерения при длине волны возбуждения 335 нм и длине волны эмиссии 440 нм, обеспечивающий предел обнаружения фумонизинов B_1 и B_2 не менее 0,5 нг при отношении уровня аналитического сигнала к уровню шума равном 3.

5.15.5 Компьютерная система обработки данных.

6 Отбор проб

Необходимо, чтобы проба, поступающая в лабораторию, была представительной и не была испорчена при транспортировании или хранении.

7 Процедура проведения испытания

7.1 Подготовка пробы

Пробу измельчают до частиц, проходящих через сито размером ячеек 1 мм. Измельченную пробу перемешивают до гомогенного состояния.

7.2 Экстракция

Пробу для анализа массой 20 г, измеренной с точностью до 0,1 г, помещают в центрифужную пробирку по 5.3. В пробирку добавляют 50 $см^3$ экстрагента по 4.14. Пробирку укупоривают, после чего встряхивают в течение 20 мин с использованием орбитального встряхивателя по 5.2. По окончании встряхивания содержимое пробирки центрифугируют в течение 10 мин при центробежном ускорении 2500 *g*. Центрифугат фильтруют через бумажный фильтр по 5.5, при этом следят, чтобы осадок не попадал на фильтр. Осадок в центрифужной пробирке подвергают повторной экстракции, для чего в пробирку вносят новую порцию экстрагента объемом 50 $см^3$. Содержимое пробирки снова встряхивают в течение 20 мин, затем центрифугируют в течение 10 мин при центробежном ускорении 2500 *g*. Центрифугат фильтруют через бумажный фильтр, фильтрованные экстракты объединяют.

Пипеткой отбирают аликвоту объединенного экстракта объемом 10,0 $см^3$ и помещают ее в колбу вместимостью 100 $см^3$. В колбу добавляют 40 $см^3$ фосфатно-хлоридного буферного раствора по 4.16, содержимое колбы тщательно перемешивают и фильтруют через стекловолоконный фильтр по 5.6. Для дальнейшей очистки на иммуноаффинной колонке отбирают аликвоту фильтрата объемом 10 $см^3$, эквивалентную 0,4 г пробы.

7.3 Очистка экстракта на колонке с иммуноаффинным сорбентом

Из входного отверстия колонки удаляют пробку и соединяют колонку с резервуаром для элюента по 5.7. Далее из выходного отверстия колонки удаляют пробку и присоединяют колонку к вакуумному манифолду по 5.11. В резервуар колонки пипеткой вносят аликвоту экстракта объемом 10 $см^3$ и пропускают ее через колонку со скоростью одна – две капли в секунду, элюат отбрасывают. Далее колонку промывают, пропуская через нее 10,0 $см^3$ фосфатно-хлоридного буферного раствора по 4.16 со скоростью одна – две капли в секунду до тех пор, пока колонка не заполнится воздухом, промывной элюат отбрасывают. Фумонизины элюируют порцией метанола по 4.2 объемом 1,5 $см^3$ со скоростью не более одной капли в секунду, элюат собирают во флакон вместимостью 4 $см^3$. Собранный элюат выпаривают досуха с помощью устройства по 5.13 в токе азота при температуре не более 60 °С. До проведения дериватизации и хроматографического анализа сухой остаток хранят при температуре около 4 °С.

7.4 Дериватизация

7.4.1 Дериватизация фумонизинов в градуировочных растворах

Дериватизацию проводят непосредственно перед хроматографическим анализом градуировочных растворов. На дно пробирки небольшой вместимости помещают 50 $мм^3$ градуировочного раствора смеси фумонизинов B_1 и B_2 и 50 $мм^3$ реактива для дериватизации по 4.19. Содержимое пробирки интенсивно перемешивают в течение 30 с с помощью миксера типа Вортекс по 5.12, после чего полученный раствор анализируют методом ВЭЖХ по 7.5.2. При этом для всех градуировочных растворов соблюдают равные промежут-

ки времени с момента внесения реактива для дериватизации до момента хроматографического анализа, которые, однако, не должны превышать 3 мин. Допускается проводить дериватизацию с использованием автоматизированной системы. Массовая концентрация фумонизинов в градуировочных растворах после дериватизации указана в таблице 2.

Таблица 2 – Массовая концентрация фумонизинов в градуировочных растворах после дериватизации

Градуировочный раствор	Массовая концентрация фумонизина B_1 в градуировочном растворе, нг/мм^3	Массовая концентрация фумонизина B_2 в градуировочном растворе, нг/мм^3
1	0,050	0,025
2	0,125	0,063
3	0,500	0,250
4	1,000	0,500

7.4.2 Приготовление раствора пробы для хроматографического анализа

Дериватизацию фумонизинов в растворе пробы проводят непосредственно перед его хроматографическим анализом. Сухой остаток, полученный после очистки экстракта по 7.3, растворяют в 200 мм^3 водно-ацетонитриль-ной смеси по 4.15. Аликвоту полученного раствора объемом 50 мм^3 помещают непосредственно на дно пробирки небольшой вместимости. В пробирку добавляют 50 мм^3 реактива для дериватизации по 4.19. Содержимое пробирки интенсивно перемешивают с помощью миксера типа Вортекс по 5.12, после чего полученный раствор анализируют с помощью ВЭЖХ по 7.5.3. При этом для серии растворов проб соблюдают равные промежутки времени с момента внесения реактива для дериватизации до момента хроматографического анализа, которые, однако, не должны превышать 3 мин.

7.5 Анализ с помощью ВЭЖХ

7.5.1 Условия хроматографического анализа

Приведенные ниже параметры обеспечивают удовлетворительное качество хроматографического анализа (см. рисунок А.1, приложение А) при использовании аналитической колонки по 5.15.3 внутренним диаметром 4,6 мм, длиной 150 мм и диаметром частиц сорбента 5 мкм, а также подвижной фазы по 4.18.

Скорость подачи подвижной фазы – 1,0 $см^3$/мин.

Параметры работы флуориметрического детектора: длина волны возбуждения 335 нм, длина волны эмиссии 440 нм.

Объем инжекции анализируемых растворов – 20 $мм^3$.

7.5.2 Анализ градуировочных растворов

Градуировку по фумонизинам B_1 и B_2 осуществляют ежедневно перед анализом растворов проб или при изменении условий хроматографического анализа. Для этого проводят хроматографический анализ приготовленных по 7.4.1 градуировочных растворов при объеме инжекции 20 $мм^3$. Для всех градуировочных растворов соблюдают равные промежутки времени с момента внесения реактива для дериватизации по 4.19 до момента хроматографического анализа, не превышающие 3 мин. Коэффициент вариации площади пиков фумонизинов B_1 и B_2, рассчитанный по результатам 10 повторных анализов градуировочного раствора смеси фумонизинов № 3 по таблице 1, не должен превышать 5 %.

7.5.3 Анализ растворов проб

Проводят хроматографический анализ растворов проб по 7.4.2 при объеме инжекции 20 $мм^3$, соответствующем 0,02 г пробы. При анализе серии растворов проб соблюдают равные промежутки времени с момента внесения реактива для дериватизации по 4.19 до момента хроматографического анализа, не превышающие 3 мин.

7.5.4 Идентификация пиков

Пики фумонизинов B_1 и B_2 на хроматограмме раствора анализируемой пробы идентифицируют по совпадению их времени удерживания со временем удерживания пиков фумонизинов B_1 и B_2 на хроматограмме градуиро-

вочного раствора. При возникновении сомнений в правильности идентификации пики фумонизинов на хроматограмме раствора пробы идентифицируют путем ее сопоставления с хроматограммой раствора пробы с добавлением градуировочного раствора фумонизинов.

7.5.5 Количественное определение

Количественное определение фумонизинов проводят методом внешнего стандарта, для чего определяют площадь или высоту пика фумонизина на хроматограмме раствора анализируемой пробы и сопоставляют ее с градуировочным графиком. При этом диапазон массовых концентраций фумонизинов, в котором построен градуировочный график, должен находиться в пределах его линейной области, которую устанавливают методом регрессионного анализа.

Объем инжекции раствора пробы для анализа должен быть равен объему инжекции градуировочных растворов, использованных при построении градуировочного графика.

Если величина пика фумонизина на хроматограмме раствора пробы для анализа превышает верхнюю границу диапазона градуировки, проводят дериватизацию и хроматографический анализ нового раствора анализируемой пробы, приготовленного путем дополнительного разбавления очищенного экстракта водно-ацетонитрильной смесью по 4.15.

Примечания:

1 Необходимо соблюдать равные промежутки времени, не превышающие 3 мин, с момента внесения реактива для дериватизации по 4.19 до момента хроматографического анализа градуировочного раствора или раствора анализируемой пробы, поскольку по истечении 3 мин интенсивность флуоресценции производных фумонизинов ослабевает с нарастающей скоростью.

2 Пределы обнаружения и количественного определения фумонизинов существенно варьируют в зависимости от чувствительности используемого детектора. Для большинства современных моделей детекторов достижимы пределы количественного определения фумонизинов B_1 и B_2 50 мкг/кг при отношении уровня аналитического сигнала к уровню шума, равном 6.

3 Типичные хроматограммы кукурузной муки и хлопьев, загрязненных фумонизинами естественным путем, представлены в приложении В.

8 Обработка результатов

По градуировочному графику определяют массу фумонизина B_1 и фумонизина B_2, нг, соответствующую площади пика фумонизина на хроматограмме раствора пробы.

Содержание каждого фумонизина в пробе, w_i, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$w_i = \frac{m_a \, V_t \, D}{W \, V_i}, \qquad (1)$$

где m_a – масса фумонизина в инжектированной аликвоте раствора пробы, нг;

V_t – объем раствора пробы для анализа после дериватизации, мм^3 ($V_t = 100$ мм^3);

D – коэффициент, соответствующий кратности разбавления раствора пробы для анализа, если таковое имело место;

W – масса пробы для анализа, эквивалентная аликвоте экстракта, взятой для дериватизации ($W = 0{,}1$ г при объеме аликвоты экстракта, взятом для дериватизации, равном 50 мм^3);

V_i – объем инжекции раствора пробы для анализа, мм^3 ($V_i = 20$ мм^3).

9 Презицонность

9.1 Общие положения

Подробности межлабораторных испытаний по определению прецизионности метода приведены в приложении А. 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 данном приложении.

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 превы-

шать предел повторяемости r более чем в 5 % случаев.

Предел повторяемости при определении фумонизина B_1 в кукурузной муке равен следующим значениям:

при $\bar{x}$ = 369 мкг/кг r = 249 мкг/кг;

при $\bar{x}$ = 646 мкг/кг r = 381 мкг/кг (искусственно загрязненная проба);

при $\bar{x}$ = 780 мкг/кг r = 412 мкг/кг;

при $\bar{x}$ = 1414 мкг/кг r = 792 мкг/кг.

Предел повторяемости при определении фумонизина B_2 в кукурузной муке равен следующим значениям:

при $\bar{x}$ = 90 мкг/кг r = 56 мкг/кг;

при $\bar{x}$ = 203 мкг/кг r = 148 мкг/кг;

при $\bar{x}$ = 295 мкг/кг r = 154 мкг/кг (искусственно загрязненная проба);

при $\bar{x}$ = 558 мкг/кг r = 350 мкг/кг.

Предел повторяемости при определении фумонизина B_1 в кукурузных хлопьях равен следующим значениям:

при $\bar{x}$ = 323 мкг/кг r = 188 мкг/кг;

при $\bar{x}$ = 565 мкг/кг r = 238 мкг/кг;

при $\bar{x}$ = 922 мкг/кг r = 238 мкг/кг (искусственно загрязненная проба);

при $\bar{x}$ = 1046 мкг/кг r = 325 мкг/кг.

Предел повторяемости при определении фумонизина B_2 в кукурузных хлопьях равен следующим значениям:

при $\bar{x}$ = 128 мкг/кг r = 78 мкг/кг;

при $\bar{x}$ = 237 мкг/кг r = 98 мкг/кг;

при $\bar{x}$ = 392 мкг/кг r = 84 мкг/кг (искусственно загрязненная проба);

при $\bar{x}$ = 457 мкг/кг r = 134 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.

Предел воспроизводимости при определении фумонизина B_1 в кукурузной муке равен следующим значениям:

при $\bar{x}$ = 369 мкг/кг R= 291 мкг/кг;

при $\bar{x}$ = 646 мкг/кг R = 459 мкг/кг (искусственно загрязненная проба);

при $\bar{x}$ = 780 мкг/кг R = 557 мкг/кг;

при $\bar{x}$ = 1414 мкг/кг R = 868 мкг/кг.

Предел воспроизводимости при определении фумонизина B_2 в кукурузной муке равен следующим значениям:

при $\bar{x}$ = 90 мкг/кг R = 56 мкг/кг;

при $\bar{x}$ = 203 мкг/кг R = 168 мкг/кг;

при $\bar{x}$ = 295 мкг/кг R = 188 мкг/кг (искусственно загрязненная проба);

при $\bar{x}$ = 558 мкг/кг R = 403 мкг/кг.

Предел воспроизводимости при определении фумонизина B_1 в кукурузных хлопьях равен следующим значениям:

при $\bar{x}$ = 323 мкг/кг R = 288 мкг/кг;

при $\bar{x}$ = 565 мкг/кг R = 440 мкг/кг;

при $\bar{x}$ = 922 мкг/кг R = 762 мкг/кг (искусственно загрязненная проба);

при $\bar{x}$ = 1046 мкг/кг R = 804 мкг/кг.

Предел воспроизводимости при определении фумонизина B_2 в кукурузных хлопьях равен следующим значениям:

при $\bar{x}$ = 128 мкг/кг R = 123 мкг/кг;

при $\bar{x}$ = 237 мкг/кг R = 182 мкг/кг;

при $\bar{x}$ = 392 мкг/кг R = 339 мкг/кг (искусственно загрязненная проба);

при $\bar{x}$ = 457 мкг/кг R = 333 мкг/кг.

10 Протокол испытаний

Протокол результатов испытаний должен содержать следующие сведения:

- всю информацию, необходимую для идентификации пробы (вид пробы, ее происхождение и назначение);

- ссылку на настоящий стандарт;

- дату и способ отбора пробы (если известны);

- дату поступления пробы в лабораторию;

- дату проведения испытания;

- результаты испытания с указанием единиц измерения;

- указание, была ли оценена повторяемость;

- все особенности, наблюдавшиеся при проведении испытания;

- все операции, не оговоренные в методике или рассматриваемые как необязательные, которые могли повлиять на результат испытания.

Приложение А

(справочное)

Данные по прецизионности метода

Приведенные в таблице А.1 данные получены в результате межлабораторных испытаний, организованных в рамках Программы по стандартизации, измерениям и испытаниям Европейского сообщества в соответствии с Руководством АОАС по проведению межлабораторных испытаний для определения характеристик эффективности методов анализа [4].

Таблица А.1 – Данные по прецизионности метода для кукурузной муки

Наименование показателя	Фумонизин B_1					Фумонизин B_2				
	Холостая проба	Проба с добавлением фумонизина 800 мкг/кг	Пробы, загрязненные фумонизинами естественным путем			Холостая проба	Проба с добавлением фумонизина 400 мкг/кг	Пробы, загрязненные фумонизинами естественным путем		
			низкое содержание фумонизинов	среднее содержание фумонизинов	высокое содержание фумонизинов			низкое содержание фумонизинов	среднее содержание фумонизинов	высокое содержание фумонизинов
Год проведения испытаний	2000					2000				
Количество лабораторий-участников	21*					21*				
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	21	21	21	20	21	21	21	17	21	21
Количество выбросов (лабораторий)	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0
Число принятых результатов	42	42	42	42	42	42	42	34	42	42
Среднее значение $\bar{X}$, мкг/кг	41	546	369	780	1414	7	295	90	203	558
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/кг	–	136	89	147	283	–	55	20	54	125
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	–	21,1	24.2	18,8	20,0	–	18,5	22,0	26,8	22.5
Предел повторяемости r ($r = 2{,}8\,s_r$), мкг/кг	–	381	249	412	792	–	154	56	148	350
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/кг	–	164	104	199	310	–	67	20	60	144
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_r, %	–	25.7	26,2	25,5	21,9	–	22,6	22,1	29,7	25,9
Предел воспроизводимости R ($R = 2{,}8\,s_R$), мкг/кг	–	459	291	557	868	–	188	56	168	403
Полнота обнаружения, %	–	75,6	–	–	–	–	72,0	–	–	–

* Две лаборатории из первоначальных 23 лабораторий – участников были исключены по причине недееспособности.

Таблица А.2 – Данные по прецизионности методики для кукурузной хлопьев

Наименование показателя	Фумонизин B_1					Фумонизин B_2				
	Холостая проба	Проба с добавлением фумонизина 800 мкг/кг	Пробы, загрязненные фумонизинами естественным путем			Холостая проба	Проба с добавлением фумонизина 400 мкг/кг	Пробы, загрязненные фумонизинами естественным путем		
			низкое содержание фумонизинов	среднее содержание фумонизинов	высокое содержание фумонизинов			низкое содержание фумонизинов	среднее содержание фумонизинов	высокое содержание фумонизинов
Год проведения испытаний	2000					2000				
Количество лабораторий-участников	21*					21*				
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	21	20	20	21	21	21	20	21	21	21
Количество выбросов (лабораторий)	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Число принятых результатов	42	40	40	42	42	42	40	42	42	42
Среднее значение $\bar{X}$, мкг/кг	42	922	323	555	1046	4	362	126	237	457
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/кг	–	85	67	85	116	–	30	28	35	48
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	–	9,2	20,6	15,0	11,1	–	7,7	21,7	14,6	10,4
Предел повторяемости r ($r = 2,8\,s_r$), мкг/кг	–	238	188	238	325	–	84	78	98	134
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/кг	–	272	103	157	287	–	121	44	65	119
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_r, %	–	29,5	31,6	27,6	27,4	–	30,9	34,6	27,5	26,1
Предел воспроизводимости R ($R = 2,8\,s_R$), мкг/кг	–	762	288	440	804	–	339	123	182	333
Полнота обнаружения, %	–	110,0	–	–	–	–	97,0	–	–	–

* Две лаборатории из первоначальных 23 лабораторий – участников были исключены по причине недееспособности.

Приложение В

(справочное)

Типичные хроматограммы

Условия хроматографического анализа:

способ дериватизации – смешивание экстракта объемом 50 мм^3 с дериватизирующим реагентом объемом 50 мм^3;

объем инжекции – 20 мм^3 (эквивалентен 20 мг анализируемой пробы);

аналитическая колонка для ВЭЖХ – длина 150 мм, внутренний диаметр 4,6 мм, заполненная сорбентом Discovery® C18[1];

подвижная фаза – смесь метанола с фосфатным буферным раствором с pH 3,35 в объемном соотношении 77 : 23;

скорость потока – 1 см^3/мин;

условия флуориметрического детектирования: длина волны возбуждения 335 нм, длина волны эмиссии 440 нм

[1] Discovery® C18 – пример подходящего сорбента, доступного для приобретения. Данная информация дана для удобства использования настоящего стандарта и не является рекламной поддержкой данного продукта. Допускается использовать другие сорбенты с аналогичными свойствами, обеспечивающие качество хроматографического разделения не хуже данного.

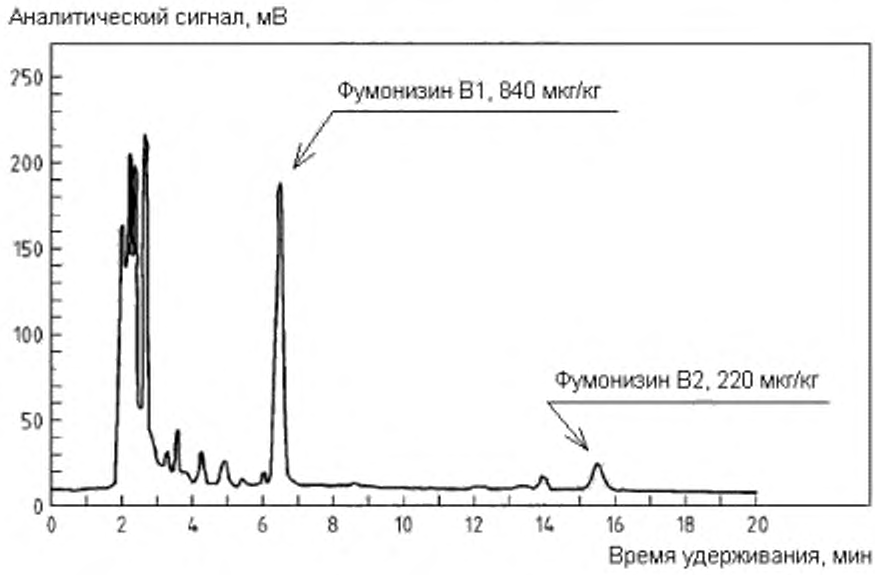


Рисунок В.1 – Типичная хроматограмма пробы кукурузных хлопьев, загрязненных фумонизинами естественным путем

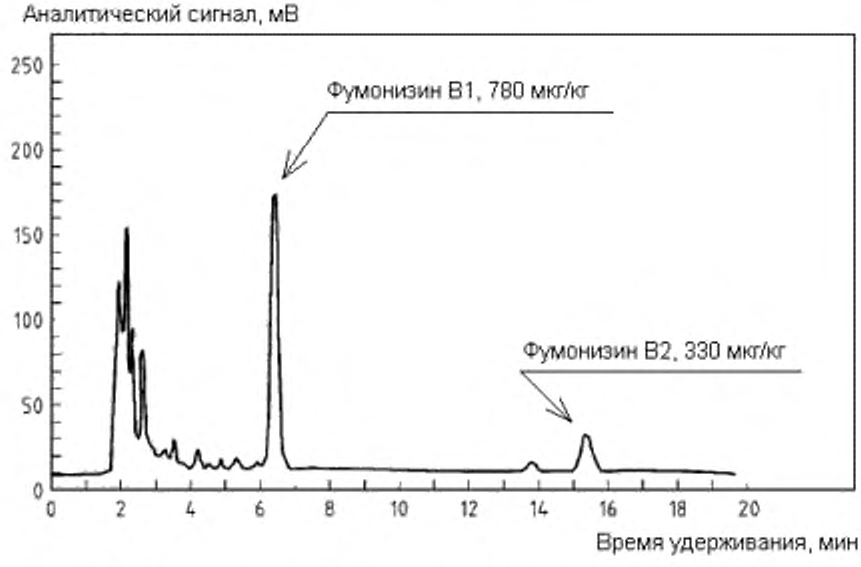


Рисунок В.2 – Типичная хроматограмма пробы кукурузной муки, загрязненной фумонизинами естественным путем

Библиография

[1] Visconti A., Solfrizzo M., De Girolamo A., 2001, Determination of fumonisin B_1 and B_2 in corn and corn flakes by high performance liquid chromatography and immunoaffinity column clean-up: collaborative study. Journal of AOAC International, 84, p. 1828 – 1837/

[2] Visconti A., Solfrizzo M., De Girolamo A., Boenke A., 2001, Determination of fumonisins at levels of interest for future EU legislation: development of an analytical method and interlaboratory validation for maize flour and corn-flakes. EU Final Report (European Commission, DG Science, Research and Development, Brussels, Belgium), EUR 19451/

[3] Solfrizzo M., De Girolamo A., Visconti A., 2001, Determination of fumonisin B_1 and B_2 in corn flakes by HPLC and immunoaffinity column clean-up. Food Additives and Contaminants, 18, p. 227 – 235/

[4] AOAC International 1995, AOAC Official Methods Program, Associate Referee's Manual on development, Study, Review and Approval Process. Part IV AOAC Guidelines for Collaborative Studies, p. 23 – 51

УДК 633.15:543.6:006.354 МКС 67.050 IDT
67.060

Ключевые слова: продукты пищевые, продукты на основе кукурузы, определение фумонизинов B_1 и B_2, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, очистка экстракта на иммуноаффинной колонке, флуориметрическое детектирование

gost.e-ecolog.ru