МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ EN 15835-
2013

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение охратоксина А в продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста

Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и флуориметрического детектирования

(EN 15835:2010, 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 15835:2010 «Foodstuffs. Determination of ochratoxin A in cereal based foods for infants and young children. HPLC method with immunoaffinity column cleanup and fluorescence detection» (Продукты пищевые. Определение охра-

токсина А в продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и флуориметрического детектирования).

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 22 ноября 2013 г. № 1707–ст межгосударственный стандарт ГОСТ EN 15835-2013 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 Оборудование
6 Процедура проведения испытания
7 Анализ с помощью ВЭЖХ
8 Обработка результатов
9 Прецизионность
10 Протокол испытаний
Приложение А (справочное) Типичные хроматограммы
Приложение В (справочное) Данные по прецизионности методики
Приложение С (справочное) Результаты внутрилабораторных испытаний
Библиография

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение охратоксина А в продуктах на зерновой основе для питания грудных детей и детей раннего возраста

Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и флуориметрического детектирования

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

Дата введения – 2015–07–01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения охратоксина А 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 охратоксином А естественным и искусственным путем, в диапазоне содержания от 0,050 мкг/кг до 0,217 мкг/кг. Подробная информация о валидации метода приведена в разделе 8 и в приложении В. Дополнительные исследования показали, что метод применим в отношении продуктов для детского питания на зерновой основе, в состав которых входят восемь различных типов злаковых культур, мед и какао при содержании охратоксина А до 3,540 мкг/кг (см. приложение С и [6]).

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ – Применение настоящего стандарта предусматривает использование опасных веществ, материалов, процедур и оборудования. В задачи настоящего стандарта не входит решение проблем, связанных с обеспечением безопасности при его применении. Ответственность за принятие надлежащих мер предосторожности и соблюдение правил техники безопасности лежит на пользователе настоящего стандарта.

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 3696:1995 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 метил-третбутиловым эфиром после добавления смешанного раствора фосфорной кислоты молярной концентрации 0,5 моль/дм^3 и хлористого натрия молярной концентрации 2 моль/дм^3. Экстракт выпаривают и перерастворяют в смеси метанола с фосфатно-хлоридным буферным раствором. После удаления липофильных компонентов гексаном экстракт пропускают через колонку с иммуноаффинным сорбентом, содержащим антитела, специфичные к охратоксину А. Охратоксин А элюируют с колонки метанолом и определяют с помощью ВЭЖХ с детектированием по флуоресценции, для усиления которой применяют послеколоночную дериватизацию аммиаком.

Примечание – В некоторых исследованиях показана возможность использования ВЭЖХ без послеколоночной дериватизации аммиаком, однако чувствительность определения при этом как минимум в два раза ниже. В этом случае необходимо использовать другие параметры флуориметрического детектирования (длину волны возбуждения 333 нм, длину волны эмиссии 460 нм).

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. Используемые рас-

творители по степени чистоты должны быть пригодны для применения в анализе с помощью ВЭЖХ. Допускается использовать доступные для приобретения готовые растворы 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*) [4].

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 хлористый.

4.6 Калий фосфорнокислый однозамещенный.

4.7 Натрий хлористый.

4.8 Натрия гидроксид.

4.9 Аммония гидроксид, водный раствор массовой долей w (NH_4OH) = 25 % (реактив для послеколоночной дериватизации).

Перед использованием раствор дегазируют с применением дегазатора по 5.21.7.

4.10 Кислота соляная, раствор массовой долей w (HCl) = 37 % (по результатам ацидиметрического анализа).

4.11 Кислота фосфорная, раствор массовой долей w (H_3PO_4) = 85 %.

4.12 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.

4.13 Натрия гидроксид, раствор молярной концентрации c(NaOH) = 0,1 моль/дм^3

Раствор готовят растворением 4 г гидроксида натрия по 4.8 в 1 дм^3 воды.

4.14 Раствор фосфатно-хлоридный буферный молярной концентрации хлористого натрия c(NaCl) = 120 ммоль/дм^3, хлористого калия c(KCl) = 2,7 ммоль/дм^3, фосфатного буфера c(Na_2HPO_4 + KH_2PO_4) = 10 ммоль/дм^3, pH 7,4

Растворяют 8,0 г хлористого натрия по 4.7, 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 4.6 и 0,2 г хлористого калия по 4.5 в 900 см^3 воды.

Значение pH приготовленного раствора доводят до 7,4 ед. pH путем добавления раствора соляной кислоты по 4.12, либо раствора гидроксида натрия по 4.13, после чего объем раствора доводят водой до 1 дм^3. В качестве альтернативы допускается использовать доступный для приобретения готовый раствор с аналогичными характеристиками.

4.15 Смешанный раствор фосфорной кислоты концентрации 0,5 моль/дм^3 и хлористого натрия молярной концентрации 2 моль/дм^3

Растворяют 118 г хлористого натрия по 4.7 примерно в 900 см^3 воды. К раствору добавляют 33 см^3 фосфорной кислоты по 4.11, объем полученного раствора доводят водой до 1 дм^3

4.16 Кислота уксусная ледяная массовой долей w (CH_3COOH) ≥ 99,7 %.

4.17 Кислота уксусная, раствор объемной долей 9 %

Смешивают 90 см^3 уксусной кислоты по 4.16 и 910 см^3 воды.

4.18 Гексан.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ – Гексан является легковоспламеняющимся веществом. Все операции, предполагающие использование этого растворителя, должны проводиться в вытяжном шкафу. Длительный контакт с этим реактивом может привести к серьезным последствиям для здоровья.

4.19 Метанол для градиентной ВЭЖХ.

4.20 Толуол.

4.21 Смесь метанола и раствора уксусной кислоты

Смешивают 72 объемных части метанола по 4.19 с 18 частями раствора уксусной кислоты по 4.17.

4.22 Метил-третбутиловый эфир

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ – Метил-третбутиловый эфир является взрывоопасным реактивом, поэтому экстракцию проб следует проводить с использованием взрывобезопасного блендера, помещенного в вытяжной шкаф. Центрифугирование экстрактов следует проводить при пониженных температурах (от 4 °С до 8 °С).

4.23 Смесь толуола и уксусной кислоты

Смешивают толуол по 4.20 с ледяной уксусной кислотой по 4.16 в объемном соотношении 99 : 1.

4.24 Подвижная фаза А для ВЭЖХ

Раствор уксусной кислоты по 4.17.

4.25 Подвижная фаза В для ВЭЖХ

Метанол по 4.19.

Подвижные фазы дегазируют, например, с использованием гелия по 4.2. Гелий барботируют через подвижные фазы в резервуарах со скоростью от 50 $см^3$/мин до 100 $см^3$/мин. В качестве альтернативы возможно также использование вакуумного дегазатора.

4.26 Колонка с иммуноаффинным сорбентом

Для проведения испытания пригодна колонка с иммуноаффинным сорбентом, содержащим иммобилизованные антитела, специфичные в отношении охратоксина А, имеющая сорбционную емкость по охратоксину А не менее 100 нг и обеспечивающая полноту обнаружения не менее 85 % при внесении в нее 3 нг охратоксина А в растворе, состоящем из 15 объемных частей метанола по 4.19 и 85 объемных частей фосфатно-хлоридного буферного раствора по 4.14.

4.27 Охратоксин А кристаллический или в виде ампульного препарата в пленочной форме.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ – Охратоксин А является сильным нефротоксином с иммунотоксическими, тератогенными и, предположительно, генотоксическими свойствами. Международное агентство по исследованию рака характеризует охратоксин А как потенциальный канцероген для человека (группа 2В). Все работы, связанные с подготовкой пробы и приготовлением стандартных растворов, должны проводиться в вытяжном шкафу с использованием защитной одежды, перчаток и защитных очков.

4.28 Охратоксин А, основной раствор

Готовят основной раствор охратоксина А номинальной массовой концентрации 10 мкг/см^3 в смеси толуола и уксусной кислоты по 4.23.

Для определения точного значения массовой концентрации охратоксина А в основном растворе регистрируют его оптическую плотность в диапазоне длин волн от 300 нм до 370 нм с интервалом 5 нм в кварцевой кювете длиной оптического пути 1 см с использованием спектрофотометра по 5.22. В качестве раствора сравнения используют смешанный растворитель по 4.23. По полученному спектру определяют длину волны, соответствующую максимальной оптической плотности. Массовую концентрацию охратоксина А, ρ_{ota}, мкг/см^3, рассчитывают по формуле

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

где A_{max} – максимальное значение оптической плотности в данном диапазоне длин волн (в данном случае при 333 нм);

M – молярная масса охратоксина А, г/моль (M = 403,8 г/моль);

ε – молярный коэффициент поглощения охратоксина А в смешанном растворителе по 4.23, м^2/моль, (ε = 544 м^2/моль);

b – длина оптического пути кюветы, см.

Основной раствор хранят при температуре около минус 18 °С. Перед использованием раствор выдерживают до достижения комнатной температу-

ры. При указанных условиях хранения срок годности раствора составляет 12 мес. При хранении основного раствора более 6 мес перед его использованием проверяют соответствие фактической массовой концентрации охратоксина А ранее установленному значению.

4.29 Охратоксин А, стандартный раствор

Пипеткой отбирают порцию основного раствора по 4.28, содержащую точно 400 нг охратоксина А, и помещают ее в мерную колбу вместимостью 10 $см^3$ по 5.13, объем содержимого в колбе доводят до метки смесью толуола с уксусной кислотой по 4.23, содержимое колбы тщательно перемешивают. Массовая концентрация охратоксина А в полученном стандартном растворе составляет 40 $нг/см^3$.

Раствор хранят при температуре около минус 18 °С. Перед использованием раствор выдерживают до достижения комнатной температуры. При указанных условиях хранения срок годности раствора составляет 12 мес. При хранении раствора более 6 мес перед его использованием проверяют соответствие фактической массовой концентрации охратоксина А ранее установленному значению.

4.30 Охратоксин А, раствор для искусственного загрязнения проб при контроле полноты обнаружения

Пипеткой отбирают порцию основного раствора по 4.28, содержащую точно 2500 нг охратоксина А, и помещают ее в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$ по 5.13, объем содержимого в колбе доводят до метки смесью толуола с уксусной кислотой по 4.23, содержимое колбы тщательно перемешивают. Массовая концентрация охратоксина А в полученном растворе составляет 50 $нг/см^3$.

Раствор хранят при температуре около минус 18 °С. Перед использованием раствор выдерживают до достижения комнатной температуры. При указанных условиях хранения срок годности раствора составляет 12 мес. При хранении раствора более 6 мес перед его использованием проверяют соответствие фактической массовой концентрации охратоксина А ранее установленному значению.

5 Оборудование

5.1 Общие положения

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

5.2 Блендер высокоскоростной.

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

5.4 Весы лабораторные, пригодные для взвешивания с точностью до 0,1 г.

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

5.6 Бумага фильтровальная, пригодная для качественного анализа.

5.7 Бумага индикаторная для определения pH в диапазоне от 0 до 14.

5.8 Центрифуга лабораторная рефрижераторная, обеспечивающая центробежное ускорение 15300 *g* и рабочую температуру 4 °С.

5.9 Стаканы центрифужные вместимостью 250 $см^3$, снабженные винтовыми крышками, химически устойчивые к воздействию метил-третбутилового эфира и обеспечивающие отсутствие деформаций при центробежном ускорении 15300 *g*.

5.10 Испаритель ротационный, снабженный водяной баней.

5.11 Корпусы от одноразовых медицинских шприцев для использования в качестве резервуаров вместимостью 5, 20 и 50 $см^3$, запорные краны и приспособления для подсоединения иммуноаффинных колонок.

5.12 Микрошприцы вместимостью 25, 50, 100, 500 и 1000 $мм^3$.

5.13 Колбы мерные вместимостью 10, 50 и 1000 $см^3$.

5.14 Насос вакуумный.

5.15 Колбы круглодонные вместимостью 100 $см^3$.

5.16 Пипетки градуированные.

5.17 Пипетки автоматические вместимостью 100 и 1000 $мм^3$, снабжен-

ные подходящими наконечниками.

5.18 Сосуды стеклянные, аналогичные сосудам для автосамплера газового хроматографа вместимостью около 1,8 $см^3$, снабженные обжимными крышками.

5.19 Воронка делительная вместимостью 250 $см^3$.

5.20 Устройство перемешивающее (миксер) типа Вортекс.

5.21 Система для ВЭЖХ в указанной ниже комплектации:

5.21.1 Инжектор, обеспечивающий объем ввода 50 $мм^3$.

5.21.2 Резервуары для подвижной фазы и реактива для послеколоночной дериватизации.

5.21.3 Насос для подачи подвижной фазы, пригодный для работы в градиентном режиме, обеспечивающий скорость потока 1 $см^3$/мин.

5.21.4 Детектор флуориметрический, позволяющий проводить измерения при длинах волн возбуждения и эмиссии соответственно 390 и 440 нм.

5.21.5 Самописец, интегратор или компьютерная система обработки данных.

5.21.6 Колонка для ВЭЖХ аналитическая, длиной 25 см, внутренним диаметром 4,7 мм, заполненная обращенно-фазовым сорбентом, например, с привитыми октадецильными группами (ODS), диаметром частиц 5 мкм, обеспечивающая отделение пика охратоксина А от сопутствующих пиков матрицы пробы. Перекрывание пика охратоксина А другими пиками не должно превышать 10 % его высоты. Для предотвращения потери работоспособности аналитической колонки следует использовать защитную колонку, заполненную подходящим обращенно-фазовым сорбентом.

5.21.7 Дегазатор (применяется по выбору пользователя) для дегазации подвижных фаз по 4.24 и 4.25 и реактива для послеколоночной дериватизации по 4.9.

5.21.8 Термостат колонок, обеспечивающий рабочую температуру (50 ± 1) °С.

5.21.9 Система для послеколоночной дериватизации, состоящая из без-

пульсационного насоса, соединительного элемента для трех капилляров, имеющего нулевой мертвый объем, и реактора в виде капилляра из нержавеющей стали длиной 10 см и внутренним диаметром 0,25 мм.

5.22 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. 25 г пробы для анализа, взвешенной с точностью до 0,1 г, помещают в центрифужный стакан по 5.9. В стакан добавляют 100 $см^3$ смешанного раствора фосфорной кислоты и хлористого натрия по 4.15. Содержимое стакана перемешивают с использованием миксера по 5.20. В стакан добавляют 50 $см^3$ метил-третбутилового эфира по 4.22. Содержимое стакана гомогенизируют в течение 2 мин с использованием высокоскоростного блендера по 5.2, после чего центрифугируют в течение 10 мин при центробежном ускорении 15300 *g* с применением охлаждения приблизительно до 4 °С.

Верхний органический слой переносят в коническую колбу с пробкой или в мерный цилиндр. Осадок в центрифужном стакане экстрагируют новой порцией метил-третбутилового эфира объемом 50 $см^3$, при этом содержимое стакана гомогенизируют в течение 2 мин и центрифугируют, как описано выше. Органические экстракты объединяют.

Аликвоту объединенного органического экстракта объемом 75 $см^3$ помещают в круглодонную колбу по 5.15 и выпаривают на ротационном испарителе по 5.10 при температуре от 35 °С до 40 °С до прекращения дистилляции растворителя. Остаток в круглодонной колбе растворяют описанным ниже способом для получения раствора экстрактивных веществ в смеси 15 объемных частей метанола по 4.19 и 85 объемных частей фосфатно-хлоридного буферного раствора по 4.14. В колбу вносят порцию метанола объемом 3 $см^3$, которой тщательно омывают внутреннюю поверхность кол-

бы. Полученный метанольный экстракт переносят с помощью пастеровской пипетки в делительную воронку по 5.19. Процедуру ополаскивания колбы повторяют еще раз, используя новую порцию метанола объемом 3 $см^3$. Метанольные экстракты объединяют в делительной воронке. Далее в делительную воронку вносят 34 $см^3$ фосфатно-хлоридного буферного раствора по 4.14, содержимое воронки интенсивно встряхивают в течение 1 мин.

В делительную воронку вносят 50 $см^3$ гексана по 4.18, содержимое воронки аккуратно встряхивают в течение 1 мин. После разделения слоев нижний слой переносят в другую делительную воронку, а верхний гексановый слой отбрасывают. Данную процедуру повторяют с использованием новой порции гексана объемом 50 $см^3$. Нижний слой переносят в центрифужный стакан по 5.9 и центрифугируют в течение 10 мин при центробежном ускорении 15300 *g* с применением охлаждения приблизительно до температуры 4 °С для отделения остатка жировых веществ. Водную фазу отделяют и фильтруют в мерный цилиндр через воронку с бумажным фильтром по 5.6.

Примечание – Следует избегать перемешивания водной и органической фаз. Если полное отделение водной фазы затруднительно, отбирают пипеткой и фильтруют не менее 35 $см^3$ водной фазы.

6.2 Очистка экстракта на колонке с иммуноаффинным сорбентом

Иммуноаффинную колонку по 4.26 подсоединяют к вакуумному манифолду по 5.5. К колонке присоединяют резервуар вместимостью 50 $см^3$ или 20 $см^3$ по 5.11.

Перед кондиционированием колонку выдерживают до достижения ею комнатной температуры. Для кондиционирования в резервуар, присоединенный к верхнему концу колонки, вносят 20 $см^3$ фосфатно-хлоридного буферного раствора по 4.14 и дают ему протечь через колонку под действием силы тяжести со скоростью от 2 до 3 $см^3$/мин. Следует принять меры к тому, чтобы небольшое количество раствора (около 0,5 $см^3$) осталось над колонкой до момента внесения раствора пробы.

Аликвоту экстракта, полученного по 6.1, объемом 30 $см^3$ вносят в резервуар и пропускают через иммуноаффинную колонку. Скорость протока

при этом не должна превышать 3 $см^3$/мин. Экстракт пропускают под действием силы тяжести, либо создавая небольшое давление с помощью шприца, либо с применением небольшого разрежения.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ – При использовании вакуумного манифолда следует обращать особое внимание на предотвращение возрастания скорости протока через колонку до величины, при которой возможны потери определяемого вещества.

6.3 Приготовление раствора пробы для хроматографического анализа

Колонку промывают, пропуская через нее 10 $см^3$ воды. Далее отсоединяют резервуар и удаляют остаток воды на внутренней поверхности верхней части колонки с помощью фильтровальной бумаги или жгута из хлопковой ваты. Затем из колонки удаляют воду с помощью вакуума или путем продувания через нее воздуха шприцем в течение 1 мин.

К колонке присоединяют резервуар по 5.11 вместимостью 5 $см^3$ и проводят элюирование охратоксина А по следующей двухступенчатой процедуре:

- в резервуар вносят 4 $см^3$ метанола и дают ему протечь через колонку. При появлении первой капли элюата закрывают запорный кран. По истечении 1 мин открывают кран и медленно элюируют охратоксин А в стеклянную пробирку;

- собирают элюат, элюирование заканчивают продуванием колонки воздухом до полного удаления из нее растворителя. Элюат выпаривают досуха в слабом токе азота (например, при давлении от 0,7 бар до 1,0 бар) при нагревании на водяной бане при температуре около 45 °С. Остаток после выпаривания растворяют в 300 $мм^3$ смеси метанола и уксусной кислоты по 4.21. Полученный раствор пробы переносят в стеклянный сосуд по 5.18 или, если предполагается немедленное проведение ВЭЖХ-анализа, непосредственно в сосуд автосамплера.

6.4 Приготовление раствора пробы с добавкой аналита для контроля полноты обнаружения

Порцию холостой пробы продукта для детского питания массой 25 г,

измеренной с точностью до 0,1 г, помещают в центрифужный стакан по 5.9. На поверхность пробы наносят 40 мм^3 раствора охратоксина А по 4.30, после чего пробу выдерживают в вытяжном шкафу не менее 2 ч для удаления растворителя. Дальнейшие операции проводят в соответствии с 6.1.

7 Анализ с помощью ВЭЖХ

7.1 Условия хроматографического анализа

Приведенные ниже параметры обеспечивают удовлетворительное качество хроматографического анализа при использовании колонки по 5.21.6 и подвижных фаз А и В по 4.24 и 4.25.

Таблица 1 – Условия градиентного элюирования

Время, мин	Скорость элюирования, см^3/мин	Объемная доля в элюенте подвижной фазы А, %	Объемная доля в элюенте подвижной фазы В, %
0	1	40	60
10	1	0	100
11	1	40	60
30	1	40	60

- температура термостата колонок, в том числе предколонки: (50 ± 1) °С;

- объем инжекции: 50 мм^3;

- температура автосамплера (применяется по выбору пользователя): от 15 °С до 20 °С;

- скорость потока раствора гидроксида аммония по 4.9: 0,2 см^3/мин.

Примечания:

1 Приемлемой альтернативой указанным условиям является анализ в изократическом режиме с использованием подвижной фазы, полученной смешиванием четырех объемных частей раствора уксусной кислоты по 4.17 и шести объемных частей метанола по 4.19. Градиентное элюирование более предпочтительно, поскольку оно продлевает срок службы колонки.

2 Необходимо, чтобы значение pH элюента на выходе из детектора находилось в щелочной области (типичное значение pH около 9). Значение pH элюента контролируют с использованием индикаторной бумаги.

3 Следует принимать меры по предотвращению распространения паров аммиака в воздухе, например, поместив в резервуар для сбора элюата насыщенный раствор лимонной кислоты.

4 Условия ВЭЖХ-анализа, оговоренные в 7.1, обеспечивают полное отделение пи-

ка охратоксина А от небольшого пика, следующего непосредственно за ним.

7.2 Приготовление градуировочных растворов

Готовят пять градуировочных растворов, для чего во флаконы по 5.18 вносят стандартный раствор охратоксина А по 4.29 в объемах, указанных в таблице 2, с помощью автоматических пипеток по 5.17 или микрошприцев по 5.12 подходящей вместимости. Растворитель (смесь толуола и уксусной кислоты) выпаривают досуха в токе азота при комнатной температуре. В каждый флакон вносят 1 $см^3$ смеси метанола и раствора уксусной кислоты по 4.21, флакон укупоривают, содержимое перемешивают с использованием миксера типа Вортекс. Диапазон массовых концентраций охратоксина А в приготовленных растворах соответствует диапазону его содержания в пробе от 0,021 мкг/кг до 0,320 мкг/кг при соблюдении условий данного метода.

Градуировочные растворы следует предохранять от воздействия света и хранить в морозильной камере при температуре около минус 18 °С.

Диапазон вариации площади пика охратоксина А при анализе одного и того же градуировочного раствора в течение короткого промежутка времени не должен превышать ± 3 % от среднего значения.

Таблица 2 – Приготовление градуировочных растворов

Градуировочный раствор	Объем стандартного раствора по 4.29, взятый для приготовления градуировочного раствора, $мм^3$	Массовая концентрация охратоксина А в градуировочном растворе, $нг/см^3$	Массовая концентрация охратоксина А в градуировочном растворе, $нг/50\ мм^3$
1	25	1,00	0,050
2	50	2,00	0,100
3	125	5,00	0,250
4	250	10,00	0,500
5	375	15,00	0,750

Примечание – Если массовая концентрация охратоксина А в анализируемом растворе пробы превышает верхнюю границу диапазона градуировки, допускается построение градуировочного графика в другом диапазоне массовых концентраций охратоксина А. В качестве альтернативы раствор пробы для хроматографического анализа разбавляют до получения в нем массовой концентрации охратоксина А, находящейся в пределах диапазона градуировки.

7.3 Построение градуировочного графика

Градуировку осуществляют ежедневно перед проведением испытаний, для чего проводят хроматографический анализ градуировочных растворов, приготовленных по 7.2, при объеме инжекции 50 мм^3. При построении градуировочного графика в системе координат откладывают значения массы охратоксина А в наногаммах, против соответствующих значения площади пика. Полученный график проверяют на соответствие требованиям линейности.

7.4 Определение охратоксина А в растворе пробы

Проводят хроматографический анализ растворов проб при объеме инжекции 50 мм^3 при тех же условиях, как и при анализе градуировочных растворов.

7.5 Идентификация пика аналита

Пик охратоксина А на хроматограмме раствора анализируемой пробы идентифицируют по совпадению его времени удерживания с временем удерживания пика охратоксина А на хроматограммах градуировочных растворов. Необходимо, чтобы массовая концентрация охратоксина А в растворе пробы находилась в границах диапазона градуировки. Если массовая концентрация охратоксина А в растворе пробы превышает верхнюю границу диапазона градуировки, допускается построение градуировочного графика в другом диапазоне. В качестве альтернативы раствор пробы разбавляют до получения в нем массовой концентрации охратоксина А в пределах диапазона градуировки. Разбавление раствора пробы учитывают во всех последующих расчетах.

8 Обработка результатов

По градуировочному графику определяют массу охратоксина А в наногаммах в инжектированной аликвоте раствора пробы.

Содержание охратоксина А в пробе, w_{ota}, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$w_{ota} = m_a \frac{V_1 V_3 V_5}{V_2 V_4 V_6 m_s}, \qquad (2)$$

где m_a – масса охратоксина А в инжектированной аликвоте раствора пробы, соответствующая площади пика охратоксина А на хроматограмме раствора пробы, нг;

V_1 – объем метил-третбутилового эфира, использованный для экстракции, см^3 ($V_1 = 100$ см^3);

V_2 – объем аликвоты эфирного экстракта, отобранной для выпаривания и перерастворения в смеси фосфатно-хлоридного буферного раствора с метанолом, см^3 ($V_2 = 75$ см^3);

V_3 – объем смеси фосфатно-хлоридного буферного раствора с метанолом, в котором перерастворена аликвота эфирного экстракта, см^3 ($V_3 = 40$ см^3);

V_4 – объем аликвоты экстракта, перерастворенного в фосфатно-хлоридном буферном растворе с метанолом, отобранной для очистки на иммуноаффинной колонке, см^3 ($V_4 = 30$ см^3);

V_5 – объем приготовленного раствора пробы для хроматографического анализа, мм^3 ($V_5 = 300$ мм^3);

V_6 – объем инжекции раствора пробы для хроматографического анализа, мм^3 ($V_6 = 50$ мм^3);

m_s – масса пробы для анализа, г ($m_s = 25$ г).

9 Презицонность

9.1 Общие положения

Подробности межлабораторных испытаний по определению прецизионности метода приведены в таблице В.1. 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 детского питания на зерновой основе равны:

$\bar{x}$ = 0,023 мкг/кг (холостая проба);

$\bar{x}$ = 0,050 мкг/кг, r = 0,066 мкг/кг (проба, загрязненная естественным путем);

$\bar{x}$ = 0,093 мкг/кг, r = 0,047 мкг/кг (искусственно загрязненная проба);

$\bar{x}$ = 0,096 мкг/кг, r = 0,122 мкг/кг (проба, загрязненная естественным путем);

$\bar{x}$ = 0,217 мкг/кг, r = 0,218 мкг/кг (проба, загрязненная естественным путем);

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 детского питания на зерновой основе равны:

$\bar{x}$ = 0,023 мкг/кг (холостая проба);

$\bar{x}$ = 0,050 мкг/кг, R = 0,089 мкг/кг (проба, загрязненная естественным путем);

$\bar{x}$ = 0,093 мкг/кг, R = 0,076 мкг/кг (искусственно загрязненная проба);

$\bar{x}$ = 0,096 мкг/кг, R = 0,122 мкг/кг (проба, загрязненная естественным путем);

$\bar{x}$ = 0,217 мкг/кг, R = 0,273 мкг/кг (проба, загрязненная естественным

путем).

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)

Типичные хроматограммы

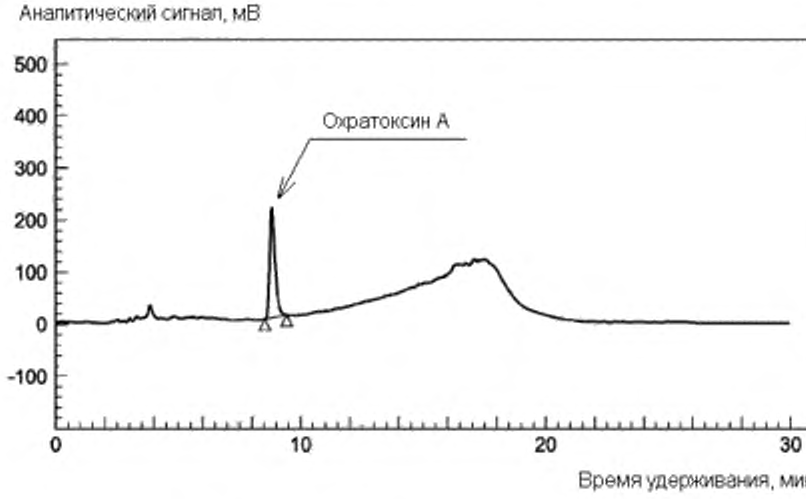

Рисунок А.1 – Хроматограмма пробы продукта для детского питания на зерновой основе, загрязненной охратоксином А естественным путем. Содержание охратоксина А 0,191 мкг/кг. Хроматограмма получена при межлабораторных испытаниях. Условия хроматографического анализа – по 7.1, градиентное элюирование

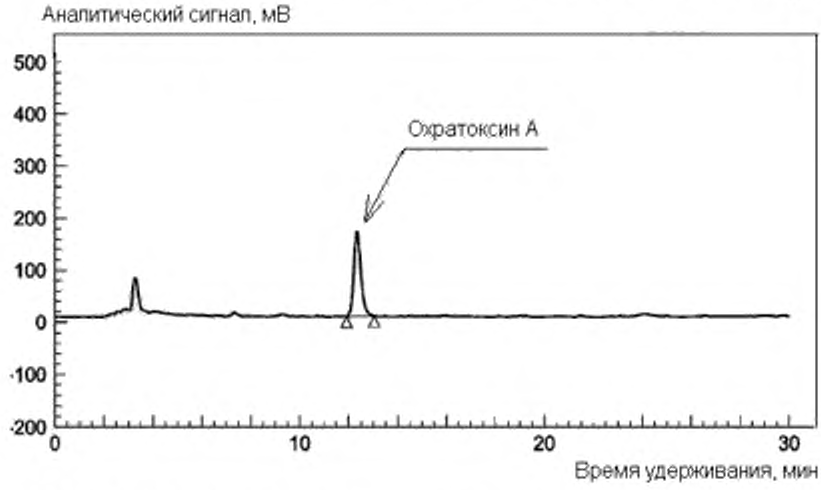

Рисунок А.2 – Хроматограмма пробы продукта для детского питания на зерновой основе, искусственно загрязненной охратоксином А. Содержание охратоксина А 0,290 мкг/кг. Хроматограмма получена при внутрилабораторных испытаниях. Условия хроматографического анализа: подвижная фаза – смесь метанола с уксусной кислотой массовой долей 9 % в объемном соотношении 60:40; изократическое элюирование

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 в соответствии с ИСО 5725–2 [1], ИСО 5725–4 [2] и ИСО 5725–6 [3]. Для этих испытаний использованы пробы продуктов для детского питания на зерновой основе, загрязненные охратоксином А как естественным, так и искусственным путем [5].

Таблица В.1 – Данные по прецизионности методики

Наименование показателя	Холостая проба	Проба с низким уровнем содержания охратоксина А	Проба со средним уровнем содержания охратоксина А	Проба с высоким уровнем содержания охратоксина А	Проба с добавленным охратоксином А
Год проведения испытаний	2000	2000	2000	2000	2000
Количество лабораторий-участников	12	12	12	12	12
Число исключенных результатов	3	1	0	1	0
Количество выбросов (лабораторий)	0	0	0	1	2
Число принятых результатов	9	11	12	10	10
Среднее значение X, мкг/кг	0,023	0,050	0,096	0,217	0,093
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/кг	–	0,023	0,044	0,078	0,017
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	–	47	45	36	18
Предел повторяемости r ($r = 2,8\ s_r$), мкг/кг	–	0,066	0,122	0,218	0,047
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/кг	–	0,032	0,044	0,097	0,027
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_r, %	–	63	45	45	29
Предел воспроизводимости R ($R = 2,8\ s_R$), мкг/кг	–	0,089	0,122	0,273	0,076
Уровень внесения охратоксина А, мкг/кг	–	–	–	–	0,085
Полнота обнаружения, %	–	–	–	–	108
Значение индекса Горвица, рассчитанное по [7]	–	0,9	0,7	0,8	0,4
Значение индекса Горвица, рассчитанное по [8]	–	2,9	2,0	2,0	1,3

Приложение С
(справочное)

Результаты внутрилабораторных испытаний

Приведенные в таблице С.1 данные получены в результате внутрилабораторных испытаний методики при ее разработке в рамках проекта SMT–CT96-2045 при Программе по стандартизации, измерениям и испытаниям Европейского сообщества (четвертый этап). Данные таблицы С.2 получены при внутрилабораторных испытаниях, организованных Centro Nacional de Alimentacion, Испания. Объектами испытаний являлись взятые из торговой сети пробы трех видов продуктов для детского питания на зерновой основе, имеющие в своем составе соответственно восемь различных видов злаков, мед и какао [6].

Таблица С.1 – Предел количественного определения (наименьшее содержание охратоксина А, при котором проведена валидация методики)

Расчетное значение предела количественного определения охратоксина А (отношение величины аналитического сигнала к величине аналитического шума равно 6)	7,00 нг/кг
Наименьшее содержание охратоксина А, при котором проведена валидация методики (проба с добавленным охратоксином А)	6,98 нг/кг
Результат испытания пробы с наименьшим уровнем внесения охратоксина А	8,20 нг/кг
Предел повторяемости *r*	0,30 нг/кг
Полнота обнаружения	117,5 %

Таблица С.2 – Данные по прецизионности методики по результатам внутрилабораторных испытаний

Наименование показателя	Среднее значение, мкг/кг	Предел повторяемости, мкг/кг	Предел внутрилабораторной воспроизводимости, мкг/кг	Полнота обнаружения, %
Продукт для детского питания, имеющий в составе восемь видов злаков				
Проба, естественным образом загрязненная охратоксином А, используемая в качестве холостой пробы	0,133	–	–	–
Холостая проба с добавкой охратоксина А	0,541	0,016	–	–
Холостая проба с добавкой охратоксина А	2,620	0,126	–	–
Холостая проба с добавкой охратоксина А	0,556	–	0,025	–
Холостая проба с добавкой охратоксина А	2,520	–	0,194	–

Окончание таблицы С.2

Образец	Среднее значение, мкг/кг	Предел повторяемости, мкг/кг	Предел внутрилабораторной воспроизводимости, мкг/кг	Полнота обнаружения, %
Полнота обнаружения при внесении охратоксина А на уровне 0,5 мкг/кг	–	–	–	90,0
Полнота обнаружения при внесении охратоксина А на уровне 3,0 мкг/кг	–	–	–	81,7
Продукт для детского питания на зерновой основе, имеющего в составе мед				
Проба, естественным образом загрязненная охратоксином А, используемая в качестве холостой пробы	0,382	–	–	–
Холостая проба с добавкой охратоксина А	0,871	0,017	–	–
Холостая проба с добавкой охратоксина А	3,540	0,028	–	–
Холостая проба с добавкой охратоксина А	0,857	–	0,024	–
Холостая проба с добавкой охратоксина А	3,410	–	0,218	–
Полнота обнаружения при внесении охратоксина А на уровне 0,5 мкг/кг	–	–	–	100,8
Полнота обнаружения при внесении охратоксина А на уровне 3,0 мкг/кг	–	–	–	100,8
Продукт для детского питания на зерновой основе, имеющего в составе какао				
Проба, естественным образом загрязненная охратоксином А, используемая в качестве холостой пробы	0,750	–	–	–
Холостая проба с добавкой охратоксина А	1,230	0,046	–	–
Холостая проба с добавкой охратоксина А	3,500	0,098	–	–
Холостая проба с добавкой охратоксина А	1,200	–	0,046	–
Холостая проба с добавкой охратоксина А	3,480	–	0,077	–
Полнота обнаружения при внесении охратоксина А на уровне 0,5 мкг/кг	–	–	–	96,3
Полнота обнаружения при внесении охратоксина А на уровне 3,0 мкг/кг	–	–	–	93,4

Библиография

[1] 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]

[2] 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]

[3] 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]

[4] 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

[5] Burdaspal P.A., Legerda T.M. and Gilbert J. (2001) Determination of Ochratoxin A in Baby Foods by Immunoaffinity Column Clean-up with Liquid Chromatography: Interlaboratory Study, Journal of AOAC International, vol. 64, 1445 – 1452

[6] Burdaspal P.A. and Legerda T.M (2004) Determination of Ochratoxin A in processed cereal based baby foods by immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography: survelliance data. Alimentaria, vol. 350, 11 – 18

[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 633.1:006.354 МКС 67.050 67.060 IDT

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

gost.e-ecolog.ru