МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ EN 14132–2013

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение охратоксина А в ячмене и жареном кофе

Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта

(EN 14132:2009, 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 № 44–2013 от 14 ноября 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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Российская Федерация	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен европейскому региональному стандарту EN 14132:2009 Foodstuffs. Determination of ochratoxin A in barley and roasted coffee. HPLC method with immunoaffinity column cleanup (Продукты пищевые. Определение охратоксина А в ячмене и жареном кофе. 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.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 1916-ст межгосударственный стандарт ГОСТ EN 14132-2013 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 Приборы и оборудование
6 Процедура проведения испытания
7 Процедура проведения испытания пробы с добавкой охратоксина А
8 Анализ с помощью ВЭЖХ
9 Обработка результатов
10 Прецизионность
11 Протокол испытаний
Приложение А (справочное) Данные по прецизионности метода
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным европейским региональным стандартам
Библиография

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение охратоксина А в ячмене и жареном кофе

Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта

Foodstuffs.
Determination of ochratoxin A in barley and roasted coffee.
HPLC method with immunoaffinity column cleanup

Дата введения – 2015–07–01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения охратоксина А в ячмене и жареном кофе с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением очистки экстракта на колонке с иммуноаффинным сорбентом. Метод прошел валидацию для диапазона содержания охратоксина А в ячмене от 0,1 до 4,5 мкг/кг и в жареном кофе от 0,2 до 5,5 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

При испытании ячменя охратоксин А экстрагируют из пробы водно-ацетонитрильной смесью, экстракт подвергают очистке на иммуноаффинной колонке. При испытании жареного кофе охратоксин А экстрагируют из измельченной пробы смесью метанола с водным раствором двууглекислого натрия. Экстракт подвергают очистке сначала на колонке с силикагелем, модифицированным фенилсилильными группами, затем на иммуноаффинной колонке. Количественное определение охратоксина А проводят методом ВЭЖХ с применением обращенно-фазовой колонки и флуориметрическим детектированием.

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 3696:1995. Используемые растворители по степени чистоты должны быть пригодны для применения в анализе с помощью ВЭЖХ. Допускается использование доступных для приобретения готовых растворов при условии, что их характеристики не отличаются от приведенных ниже.

4.2 Натрий хлористый.

4.3 Натрий фосфорнокислый двухзамещенный.

4.4 Калий фосфорнокислый однозамещенный.

4.5 Калий хлористый.

4.6 Натрия гидроксид, раствор массовой концентрации ρ (NaOH) = 8,0 г/ дм^3

Растворяют 8 г гидроксида натрия в 900 см^3 воды, объем полученного раствора доводят водой до 1 дм^3.

4.7 Раствор фосфатно-хлоридный буферный

Растворяют 8,0 г хлористого натрия по 4.2, 1,2 г двухзамещенного фосфорнокислого натрия по 4.3, 0,2 г однозамещенного фосфорнокислого

калия по 4.4 и 0,2 г хлористого калия по 4.5 в 900 $см^3$ воды. Значение pH полученного раствора доводят до 7,4 ед. pH путем добавления раствора гидроксида натрия по 4.13, после чего объем раствора доводят водой до 1 $дм^3$. В качестве альтернативы допускается использовать доступный для приобретения таблетированный препарат аналогичного состава.

4.8 Натрий двууглекислый, раствор массовой концентрации ρ ($NaHCO_3$) = 30 г/$дм^3$

Растворяют 30 г двууглекислого натрия в 900 $см^3$ воды в мерной колбе вместимостью 1 $дм^3$. Объем содержимого колбы доводят до метки водой.

4.9 Кислота уксусная ледяная массовой долей w (CH_3COOH) = 98 %.

4.10 Метанол.

4.11 Ацетонитрил.

4.12 Толуол.

4.13 Смесь толуола с уксусной кислотой

Смешивают 99 объемных частей толуола по 4.12 с одной объемной частью уксусной кислоты по 4.9.

4.14 Экстрагент для ячменя

Смешивают шесть объемных частей ацетонитрила по 4.11 с четырьмя объемными частями воды.

4.15 Экстрагент для кофе

Смешивают одну объемную часть метанола по 4.10 с одной объемной частью раствора двууглекислого натрия по 4.8.

4.16 Дилюент для приготовления раствора пробы для анализа с помощью ВЭЖХ

Смешивают 30 объемных частей метанола по 4.10 с 70 объемными частями воды и одной объемной частью уксусной кислоты по 4.9.

4.17 Подвижная фаза

Смешивают 102 объемные части воды с 96 объемными частями ацетонитрила по 4.11 и двумя объемными частями уксусной кислоты по 4.9. По-

движную фазу фильтруют через мембранный фильтр диаметром пор 0,2 мкм по 5.12. Перед использованием подвижную фазу дегазируют.

4.18 Раствор 1 для промывания колонки с фенилсилильным сорбентом

Смешивают 20 объемных частей метанола по 4.10 с 80 объемными частями раствора двууглекислого натрия по 4.8.

4.19 Раствор 2 для промывания колонки с фенилсилильным сорбентом массовой концентрации двууглекислого натрия ρ **(Na_2CO_3) = 1 г/100 см^3**

Растворяют 1 г двууглекислого натрия в 90 см^3 воды в мерной колбе вместимостью 100 см^3, объем содержимого в колбе доводят водой до метки.

4.20 Элюент для очистки экстракта на фенилсилильной колонке

Смешивают семь объемных частей метанола по 4.10 с 93 объемными частями воды.

4.21 Охратоксин А, основной раствор

Для приготовления основного раствора 1 мг кристаллического охратоксина А или, при использовании ампульного препарата в пленочной форме, содержимое одной ампулы растворяют в таком объеме смеси толуола с уксусной кислотой по 4.13, чтобы массовая концентрация охратоксина А в полученном растворе составила от 20 до 30 мкг/см^3.

Для определения точной массовой концентрации охратоксина А в основном растворе регистрируют его оптическую плотность в диапазоне длин волн от 300 до 370 нм с интервалом 5 нм в кварцевой кювете длиной оптического пути 1 см по 5.14. В качестве раствора сравнения используют смесь толуола с уксусной кислотой по 4.13. 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 диапа-

зоне длин волн (λ_{max} = 333 нм);

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

ε – молярный коэффициент поглощения охратоксина А в смешанном растворителе по 4.13, м^2/моль, (ε = 544 м^2/моль);

b – длина оптического пути кюветы, см.

Основной раствор хранят при температуре около минус 18 °С, при этом срок его годности составляет не менее четырех лет.

4.22 Охратоксин А, стандартный раствор промежуточной массовой концентрации

Раствор готовят разбавлением основного раствора по 4.21 смесью толуола с уксусной кислотой по 4.13 до получения раствора массовой концентрации охратоксина А 10 мкг/см^3.

Раствор хранят в холодильнике при температуре около 4 °С. Перед использованием проверяют соответствие фактической массовой концентрации охратоксина А номинальному значению.

4.23 Охратоксин А, стандартный раствор для приготовления градуировочных растворов

В стеклянный флакон помещают 200 мм^3 стандартного раствора охратоксина А массовой концентрации 10 мкг/см^3 по 4.22. Раствор разбавляют до объема 1 см^3 путем добавления 800 мм^3 смеси толуола с уксусной кислотой по 4.13, получают раствор охратоксина А массовой концентрации 2 мкг/см^3. Порцию полученного раствора объемом 100 мм^3 переносят микропипеткой в другой стеклянный флакон по 5.2, удаляют растворитель в токе азота, сухой остаток перерастворяют в 10 см^3 дилюента по 4.16, предварительно фильтрованного через мембранный фильтр размером пор 0,2 мкм по 5.12. Массовая концентрация охратоксина А в полученном растворе составляет 20 нг/см^3. Раствор готовят в день проведения испытания.

4.24 Охратоксин А, раствор для внесения в пробу при контроле полноты обнаружения

В стеклянный флакон вносят микропипеткой 100 мм^3 стандартного

раствора охратоксина А массовой концентрации 10 мкг/см^3 по 4.22. Объем содержимого флакона доводят до 2 см^3 добавлением 1,9 см^3 смеси толуола с уксусной кислотой по 4.13. Массовая концентрация охратоксина А в полученном растворе составляет 500 нг/см^3.

4.25 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. Каждую партию колонок проверяют на пригодность для использования путем внесения в колонку 100 нг охратоксина А в растворителе, идентичном растворителю экстракта из пробы при его внесении в колонку по 6.1.2, при этом полнота обнаружения охратоксина А должна быть не менее 85 %.

4.26 Колонка для твердофазной экстракции с силикагелем, модифицированным фенилсилильными группами

Для проведения испытания пригодна колонка, содержащая 500 мг сорбента, с резервуаром вместимостью 3 см^3, толщиной слоя сорбента, достаточной для предотвращения потерь аналита из-за его прохождения сквозь колонку без связывания. Сорбционная емкость колонки по охратоксину А должна быть не меньше 100 нг. Колонка должна обеспечивать полноту обнаружения не менее 85 % при внесении в нее 100 нг охратоксина А в растворителе, идентичном экстрагенту для кофе по 4.15.

5 Приборы и оборудование

При проведении испытания используют общеупотребительное лабораторное оборудование, в частности, перечисленное ниже.

5.1 Весы аналитические, пригодные для взвешивания с точностью до 0,01 мг.

5.2 Флаконы стеклянные вместимостью 10 см^3

При использовании некоторых стеклянных флаконов возможны потери

охратоксина А при выпаривании раствора. Для их предотвращения внутреннюю поверхность флаконов силанизируют, для чего флаконы заполняют силанизирующим реактивом и оставляют в покое на 1 мин. Затем флаконы дважды ополаскивают сначала растворителем (толуолом, ацетоном или гексаном), затем водой, после чего высушивают.

5.3 Блендер лабораторный взрывозащищенного исполнения с контейнером вместимостью 1 $дм^3$, снабженным крышкой, обеспечивающий скорость вращения диспергирующего элемента до 20000 $мин^{-1}$.

5.4 Пипетки автоматические вместимостью 200 $мм^3$, 1 и 5 $см^3$ в комплекте с подходящими наконечниками.

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

5.6 Резервуары для элюента в комплекте с приспособлениями для установки иммуноаффинных колонок.

5.7 Насос вакуумный, обеспечивающий разрежение 10 мбар производительностью не менее 18 $дм^3$/мин.

5.8 Встряхиватель лабораторный.

5.9 Центрифуга лабораторная рефрижераторная, обеспечивающая центробежное ускорение 1300*g* и рабочую температуру 4 °С.

5.10 Пробирки центрифужные вместимостью 50 $см^3$.

5.11 Фильтры бумажные размером пор от 20 до 25 мкм, или аналогичные.

5.12 Фильтры мембранные полисульфоновые шприцевые размером пор 0,2 мкм, диаметром 25 мм.

5.13 Система для ВЭЖХ в указанной ниже комплектации

5.13.1 Инжектор петлевого типа, обеспечивающий объем инжекции 100 $мм^3$.

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

5.13.3 Колонка для ВЭЖХ аналитическая, заполненная обращенно-

фазовым сорбентом, например, с привитыми октадецильными группами (ODS), обеспечивающая отделение пика охратоксина А от сопутствующих пиков матрицы пробы. Перекрывание пика охратоксина А другими пиками не должно превышать 10 % его высоты. При необходимости для достижения требуемой степени разделения пиков проводят корректировку состава подвижной фазы. Для предотвращения потери работоспособности аналитической колонки рекомендуется использовать защитную колонку.

5.13.4 Детектор флуориметрический с проточной кюветой, пригодный для проведения измерений при длинах волн возбуждения и эмиссии соответственно 333 и 460 нм.

5.13.5 Компьютерная система обработки данных.

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

6 Процедура проведения испытания

6.1 Определение охратоксина А в ячмене

6.1.1 Экстракция

Лабораторную пробу измельчают до частиц, проходящих через сито размером ячейки 0,5 мм. 25 г пробы для анализа, взвешенной с точностью до 0,1 г, помещают в контейнер блендера по 5.3. В контейнер добавляют 100 $см^3$ экстрагента по 4.14, контейнер закрывают крышкой и гомогенизируют его содержимое в течение 3 мин при скорости вращения диспергирующего элемента 20000 $мин^{-1}$. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр по 5.11.

6.1.2 Очистка экстракта на колонке с иммуноаффинным сорбентом

Иммуноаффинную колонку подготавливают к использованию в соответствии с инструкциями изготовителя.

Аликвоту фильтрата, полученного по 6.1.1, объемом 4 $см^3$ переносят с помощью пипетки в стакан, куда добавляют 44 $см^3$ фосфатно-хлоридного буферного раствора по 4.7. Иммуноаффинную колонку по 4.25 устанавливают в вакуумный манифолд, к входному концу колонки присоединяют резер-

вуар по 5.6. В резервуар вносят экстракт, разбавленный фосфатно-хлоридным буферным раствором, и пропускают его через колонку со скоростью не более 5 см^3/мин. При этом не допускают попадания в колонку воздуха. Колонку промывают 10 см^3 воды, после чего ее отсоединяют от манифолда и высушивают путем пропускания через нее воздуха не менее чем в двукратном объеме. Затем колонку устанавливают над стеклянным флаконом по 5.2, предназначенным для сбора элюата.

6.1.3 Приготовление раствора пробы для хроматографического анализа

Охратоксин А элюируют с использованием подходящего растворителя в соответствии с рекомендациями изготовителя колонки. Элюат собирают в стеклянный флакон по 5.2. По окончании элюирования растворитель удаляют в токе азота при температуре около 50 °С. Сухой остаток перерастворяют в 1,0 см^3 дилюента по 4.16 (V_3), раствор фильтруют через мембранный фильтр размером пор 0,2 мкм по 5.12. Полученный раствор пробы для хроматографического анализа переносят во флакон автосамплера хроматографа.

6.2 Определение охратоксина А в жареном кофе

6.2.1 Экстракция

Лабораторную пробу измельчают до частиц, проходящих через сито размером ячейки 1 мм. Пробу для анализа массой 15 г, взвешенной с точностью до 0,1 г, помещают в коническую колбу вместимостью 500 см^3, куда добавляют 150 см^3 экстрагента по 4.15. Колбу закрывают пробкой, содержимое колбы встряхивают в течение 30 мин. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр по 5.11. Порцию фильтрата объемом 50 см^3 помещают в центрифужную пробирку по 5.10 и центрифугируют при центробежном ускорении 1300g в течение 15 мин при температуре 4 °С.

6.2.2 Очистка экстракта на колонке с фенилсилильным сорбентом

Колонку с фенилсилильным сорбентом по 4.26 устанавливают в вакуумный манифолд по 5.5. На стадии подготовки колонки к использованию не следует применять разрежение. При необходимости скорость протока рас-

творителя через колонку увеличивают, создавая некоторое избыточное давление с помощью азота. Колонку кондиционируют, пропуская через нее сначала 15 $см^3$ метанола, затем 5 $см^3$ раствора двууглекислого натрия по 4.8, элюат отбрасывают.

Аликвоту прозрачного центрифугированного экстракта по 6.2.1 объемом 10 $см^3$ помещают в стакан, куда добавляют 10 $см^3$ раствора двууглекислого натрия по 4.8. Разбавленный таким образом экстракт пропускают через фенилсилильную колонку, при этом скорость протока не должна превышать 5 $см^3$/мин. Далее через колонку пропускают сначала 10 $см^3$ промывного раствора 1 по 4.18, затем 5 $см^3$ промывного раствора 2 по 4.19, при этом скорость протока также не должна превышать 5 $см^3$/мин. После этого колонку отсоединяют от манифолда и высушивают путем пропускания через нее с помощью шприца не менее 10 $см^3$ воздуха. Затем колонку устанавливают над стеклянным флаконом подходящей вместимости и элюируют охратоксин А с помощью 10 $см^3$ элюента по 4.20 при скорости протока, не превышающей 5 $см^3$/мин.

6.2.3 Очистка экстракта на колонке с иммуноаффинным сорбентом

Полученный по 6.2.2 элюат разбавляют 30 $см^3$ фосфатно-хлоридного буферного раствора по 4.7. Иммуноаффинную колонку по 4.25 устанавливают в вакуумный манифолд, к входному концу колонки присоединяют резервуар по 5.6. В резервуар вносят элюат, разбавленный фосфатно-хлоридным буферным раствором, и пропускают его через колонку со скоростью не более 5 $см^3$/мин. При этом не допускается попадание в колонку воздуха. Колонку промывают 10 $см^3$ воды, после чего ее отсоединяют от манифолда и помещают над стеклянным флаконом по 5.2, предназначенным для сбора элюата.

6.2.4 Приготовление раствора пробы для хроматографического анализа

Охратоксин А элюируют четырьмя порциями элюента, указанного в инструкции по применению колонки, объемом 1 $см^3$ каждая, элюат собирают во флакон по 5.2. По окончании элюирования растворитель удаляют в токе

азота при температуре около 50 °С. Сухой остаток перерастворяют в 1,0 см^3 дилюента по 4.16 (V_3), раствор фильтруют через мембранный фильтр размером пор 0,2 мкм по 5.12. Полученный раствор пробы для хроматографического анализа переносят во флакон автосамплера хроматографа.

7 Процедура проведения испытания пробы с добавкой охратоксина А

7.1 Испытание пробы ячменя с добавкой охратоксина А

Пробу для анализа массой 25 г, взвешенной с точностью до 0,1 г, помещают в контейнер блендера, куда затем добавляют 200 мм^3 раствора охратоксина А по 4.24. Контейнер с пробой оставляют на ночь в вытяжном шкафу для удаления растворителя. Дальнейшую процедуру проводят в соответствии с 6.1.

7.2 Испытание пробы жареного кофе с добавкой охратоксина А

Пробу кофе измельчают до частиц, проходящих через сито размером ячейки 1 мм. Отбирают пробу для анализа массой 15 г, взвешенной с точностью до 0,1 г, и помещают ее в коническую колбу вместимостью 500 см^3, куда затем вносят 120 мм^3 раствора охратоксина А по 4.24. Контейнер с пробой оставляют на ночь в вытяжном шкафу для удаления растворителя. Дальнейшую процедуру проводят в соответствии с 6.2.

8 Анализ с помощью ВЭЖХ

8.1 Приготовление градуировочных растворов

Градуировку осуществляют в день проведения испытания перед хроматографическим анализом растворов проб или в случае изменения условий хроматографического анализа.

Готовят пять градуировочных растворов в соответствии с таблицей 1, для чего в мерные колбы вместимостью по 5 см^3 пипеткой вносят различные объемы стандартного раствора по 4.23, объем содержимого в колбах доводят до метки дилюентом по 4.16, фильтрованным через мембранный фильтр.

Таблица 1 – Приготовление градуировочных растворов

Градуировочный раствор	Объем стандартного раствора по 4.23, взятый для приготовления градуировочного раствора, мм^3	Объем диluента по 4.16, использованный для приготовления градуировочного раствора, мм^3	Массовая концентрация охратоксина А в градуировочном растворе, нг/см^3
1	125	4875	0,5
2	250	4750	1,0
3	500	4500	2,0
4	1250	3750	5,0
5	2500	2500	10,0

8.2 Условия хроматографического анализа

Приведенные ниже параметры обеспечивают приемлемое качество хроматографического анализа при использовании аналитической колонки по 5.13.3 длиной 250 мм, внутренним диаметром 4.6 мм и диаметром частиц сорбента 5 мкм.

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

Параметры работы флуориметрического детектора: длина волны возбуждения 333 нм, длина волны эмиссии 460 нм.

Объем инжекции – 100 мм^3 (V_4).

8.3 Идентификация пика аналита

Пик охратоксина А на хроматограмме раствора пробы идентифицируют по совпадению его времени удерживания с временем удерживания пика охратоксина А на хроматограммах градуировочных растворов. При возникновении сомнений в правильности идентификации пик охратоксина А на хроматограмме раствора пробы идентифицируют путем ее сопоставления с хроматограммой раствора пробы с добавлением градуировочного раствора охратоксина А.

8.4 Количественное определение

Количественное определение проводят по методу внешнего стандарта.

При этом либо осуществляют градуировку по одному градуировочному раствору, площадь или высота пика аналита на хроматограмме которого наиболее близки к площади или высоте пика аналита на хроматограмме раствора пробы, либо используют градуировочный график. В последнем случае проводят анализ нескольких градуировочных растворов, при этом необходимо, чтобы массовые концентраций охратоксина А в них находились в пределах линейного участка градуировочной зависимости.

Соблюдают одинаковые объемы инжекции при анализе раствора пробы и градуировочных растворов.

Если аналитический сигнал, относящийся к пику охратоксина А в растворе пробы, выходит за верхнюю границу диапазона градуировки, раствор пробы разбавляют в необходимой мере.

9 Обработка результатов

По градуировочной характеристике определяют массу охратоксина А, нг, в инжектированной аликвоте раствора пробы.

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

$$w_{ota} = m_a \frac{V_3}{V_4} \frac{V_1}{V_2} \frac{1000}{m_s} \frac{1}{1000}, \qquad (2)$$

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

m_s – масса анализируемой пробы, г (m_s = 25 г для ячменя и m_s = 15 г для кофе);

V_3 – объем приготовленного раствора пробы для хроматографического анализа по 6.1.3 и 6.2.3, см^3 (V_3 = 1,0 см^3);

V_1 – объем экстрагента, использованный для экстракции, см^3 (V_1 = 100 см^3 для ячменя и V_1 = 150 см^3 для кофе);

V_4 – объем инжекции раствора пробы для хроматографического анализа по 6.2, см^3;

V_2 – объем аликвоты экстракта, отобранной для очистки на иммуноаффинной колонке, см^3 (V_2 = 4,0 см^3 для ячменя по 6.2.1 и V_2 = 10 см^3 для кофе по 6.2.2).

Результат испытания выражают в микрограммах на килограмм, или в нанограммах на грамм.

10 Презиционность

10.1 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 приложении А.

10.2 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 ячменя равны:

$\bar{x}$ = 0,1 мкг/кг r = 0,112 мкг/кг (холостая проба);

$\bar{x}$ = 1,3 мкг/кг r = 0,896 мкг/кг (проба, загрязненная охратоксином А естественным путем);

$\bar{x}$ = 3,0 мкг/кг r = 1,036 мкг/кг (проба, загрязненная охратоксином А естественным путем);

$\bar{x}$ = 3,7 мкг/кг r = 0,448 мкг/кг (проба с добавкой охратоксина А);

$\bar{x}$ = 4,5 мкг/кг r = 1,792 мкг/кг (проба, загрязненная охратоксином А естественным путем).

Значения предела повторяемости для кофе равны:

$\bar{x}$ = 0,2 мкг/кг r = 0,112 мкг/кг (холостая проба);

$\bar{x}$ = 1,2 мкг/кг r = 0,756 мкг/кг (проба, загрязненная охратоксином А естественным путем);

$\bar{x}$ = 2,7 мкг/кг r = 0,868 мкг/кг (проба, загрязненная охратоксином А естественным путем);

$\bar{x}$ = 3,5 мкг/кг r = 0,588 мкг/кг (проба с добавкой охратоксина А);

$\bar{x}$ = 5,5 мкг/кг r = 0,308 мкг/кг (проба, загрязненная охратоксином А естественным путем).

10.3 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 ячменя равны:

$\bar{x}$ = 0,1 мкг/кг R = 0,280 мкг/кг (холостая проба);

$\bar{x}$ = 1,3 мкг/кг R = 1,232 мкг/кг (проба, загрязненная охратоксином А естественным путем);

$\bar{x}$ = 3,0 мкг/кг R = 1,456 мкг/кг (проба, загрязненная охратоксином А естественным путем);

$\bar{x}$ = 3,7 мкг/кг R = 1,204 мкг/кг (проба с добавкой охратоксина А);

$\bar{x}$ = 4,5 мкг/кг R = 1,876 мкг/кг (проба, загрязненная охратоксином А естественным путем).

Значения предела воспроизводимости для кофе равны:

$\bar{x}$ = 0,2 мкг/кг R = 0,308 мкг/кг (холостая проба);

$\bar{x}$ = 1,2 мкг/кг R = 0,896 мкг/кг (проба, загрязненная охратоксином А естественным путем);

$\bar{x}$ = 2,7 мкг/кг R = 1,120 мкг/кг (проба, загрязненная охратоксином А естественным путем);

$\bar{x}$ = 3,5 мкг/кг R = 1,288 мкг/кг (проба с добавкой охратоксина А);

$\bar{x}$ = 5,5 мкг/кг R = 2,184 мкг/кг (проба, загрязненная охратоксином А

естественным путем).

11 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 методике или рассматриваемые как необязательные, которые могли повлиять на результат испытания.

Приложение А
(справочное)

Данные по прецизионности метода

Приведенные в таблицах А.1 и А.2 данные получены в результате межлабораторных испытаний [2], [3], организованных в соответствии с [4].

Таблица А.1 Данные по прецизионности метода для ячменя

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	1998–1999	1998–1999	1998–1999	1998–1999	1998–1999
Количество лабораторий-участников	15	15	15	15	15
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	14	15	14	12	12
Количество выбросов (лабораторий)	1	0	1	3	3
Число принятых результатов	14	15	14	12	12
Среднее значение $\bar{X}$, мкг/кг	0,1	1,3	3,0	4,5	3,7
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/кг	0,04	0,32	0,37	0,64	0,16
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	26	24	12	14	4
Предел повторяемости r (r = 2,8 s_r), мкг/кг	0,112	0,896	1,036	1,792	0,448
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/кг	0,10	0,44	0,52	0,67	0,43
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	72	33	17	15	12
Предел воспроизводимости R (R= 2,8 s_R), мкг/кг	0,280	1,232	1,456	1,876	1,204
Полнота обнаружения, %	–	–	–	–	93 ± 10

* Результат испытания холостой пробы находится на уровне предела обнаружения.

Таблица А.2 Данные по прецизионности методики для жареного кофе

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	1998–1999	1998–1999	1998–1999	1998–1999	1998–1999
Количество лабораторий-участников	15	15	15	15	15
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	14	15	14	12	13
Количество выбросов (лабораторий)	1	0	1	3	2
Число принятых результатов	14	15	14	12	13
Среднее значение $\bar{x}$, мкг/кг	0,2	1,2	2,7	5.5	3,5
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/кг	0,04	0,27	0,31	0,11	0,21
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	28	22	11	2	6
Предел повторяемости r ($r = 2,8\ s_r$), мкг/кг	0,112	0,756	0,868	0,308	0,588
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/кг	0,11	0,32	0,40	0,78	0,46
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	71	26	15	14	13
Предел воспроизводимости R ($R = 2,8\ s_R$), мкг/кг	0,308	0,896	1,120	2,184	1,288
Полнота обнаружения, %	-	–	–	–	88 ± 15
* Результат испытания холостой пробы находится на уровне предела обнаружения.					

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным европейским региональным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного европейского регионального стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
EN ISO 3696 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний	–	*

* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык данного европейского регионального стандарта или гармонизированный с ним национальный (государственный) стандарт страны, на территории которой применяется настоящий стандарт. Информация о наличии данного европейского регионального стандарта в национальном фонде стандартов или в ином месте, а также информация о действии на территории страны соответствующего национального (государственного) стандарта может быть приведена в национальных информационных данных, дополняющих настоящий стандарт.

Библиография

[1] Castegnaro M., Barek J., Fremy J. M., Lafontaine M., Miraglia 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, 63 p.

[2] EC, BRC Information, Report on Workpackage 4.9: Immunoaffinity Column Clean-up with Liquid Chromatography for the Determination of Ochratoxin A in Barley: Collaborative Study, Contract No. SMT4-CT96-2045, 1999, EUR 18954 EN

[3] EC, BRC Information, Report on Workpackage 4.9: Combined Phenyl Silane & Immunoaffinity Column Clean-up HPLC Method for the Determination of Ochratoxin A in Roasted Coffee: Collaborative Study, Contract No. SMT4-CT96-2045, 2000, EUR 19504 EN

[4] Guidelines for Collaborative Study to Validate Characteristics of a Method of Analysis J.AOAC Int., 1989, 72, 694–704

УДК 633.16:663.93:006.354 МКС 67.060 IDT
67.140.20

Ключевые слова: продукты пищевые, определение охратоксина А, ячмень, кофе жареный, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, очистка экстракта на иммуноаффинной колонке, флуориметрическое детектирование

gost.e-ecolog.ru