МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33780— 2016

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ, КОРМА, КОМБИКОРМА

Определение содержания афлатоксина B_1 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением очистки на оксиде алюминия

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

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 РАЗРАБОТАН Обществом с ограниченной ответственностью «Люмэкс-маркетинг» (ООО «Люмэкс-маркетинг»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 20 апреля 2016 г. № 87-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 23 мая 2016 г. № 374-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33780—2016 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2017 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном 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 (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, 2016

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Отбор и подготовка лабораторных проб . . . 2
4 Требования безопасности . . . 2
5 Сущность метода . . . 2
6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, стандартные образцы, реактивы, посуда и материалы . . . 2
7 Условия проведения испытаний . . . 4
8 Подготовка к проведению испытаний . . . 4
9 Проведение испытаний . . . 8
10 Обработка результатов испытаний . . . 9
11 Метрологические характеристики . . . 9
12 Контроль качества результатов измерений . . . 10
13 Оформление результатов испытаний . . . 10
Приложение А (рекомендуемое) Требования безопасности при работе с афлатоксинами . . . 12
Приложение Б (рекомендуемое) Оптимизация состава подвижной фазы . . . 13
Приложение В (рекомендуемое) Приготовление раствора афлатоксина B_1 из кристаллического препарата . . . 14

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ, КОРМА, КОМБИКОРМА

Определение содержания афлатоксина B_1 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением очистки на оксиде алюминия

Foodstuffs, feeds, compound feeds. Determination of aflatoxin B_1 content by method of high performance liquid chromatography using aluminum oxide clean-up

Дата введения — 2017—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты, корма, комбикорма и сырье для их производства и устанавливает метод определения массовой доли афлатоксина B_1 с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее — ВЭЖХ) после очистки экстракта на колонке с оксидом алюминия. Настоящий стандарт не распространяется на кофе, кофепродукты, а также продукты питания для детей, беременных и кормящих женщин.

Диапазон измерений массовой доли афлатоксина B_1 составляет от 0,0002 до 0,05 млн$^{-1}$.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004—91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.010—76 Система стандартов безопасности труда. Взрывобезопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.019—79[1)] Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 84—76 Реактивы. Натрий углекислый 10-водный. Технические условия

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

ГОСТ 4204—77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 5556—81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ ИСО 5725-6—2003[2)] Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

[1)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

[2)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

Издание официальное

ГОСТ 16317—87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ ИСО/МЭК 17025—2009 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные. Типы. Основные параметры и размеры

ГОСТ 28311—89 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

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

ГОСТ 33303—2015 Продукты пищевые. Методы отбора проб для определения микотоксинов

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Отбор и подготовка лабораторных проб

Отбор и подготовка лабораторных проб — по ГОСТ 33303.

4 Требования безопасности

При проведении испытаний следует соблюдать требования:

- электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019 и технической документацией на хроматограф;
- взрывобезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.010;
- пожарной безопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.004;
- безопасности при работе с вредными веществами в соответствии с ГОСТ 12.1.007.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Афлатоксин B_1 — высокотоксичное вещество, которое вызывает поражение печени и является канцерогеном. При работе с ним, его растворами, а также при работе с пробами, которые содержат или могут содержать афлатоксин B_1, следует соблюдать правила безопасности, изложенные в приложении А.

5 Сущность метода

Метод основан на экстракции афлатоксина B_1 из пробы смесью ацетонитрил — вода, очистке экстракта на колонке с оксидом алюминия, переводе афлатоксина B_1 в интенсивно флуоресцирующее соединение обработкой трифторуксусной кислотой (далее — ТФУ), определении массовой доли афлатоксина B_1 в форме ТФУ-производного методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием.

6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, стандартные образцы, реактивы, посуда и материалы

6.1 Хроматограф жидкостный с флуориметрическим или спектрофлуориметрическим детектором, обеспечивающим возбуждение флуоресценции в спектральной области (365 ± 20) нм и регистрацию интенсивности флуоресценции в спектральной области (440 ± 20) нм. Применяемый детектор должен обеспечивать предел обнаружения афлатоксина B_1 не более 0,3 нг/см^3.

6.2 Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,01 г.

6.3 Колонка хроматографическая аналитическая, заполненная обращенно-фазовым сорбентом зернением 5 мкм, например колонка внутренним диаметром 2,1 мм длиной 150 мм, заполненная обращенно-фазовым сорбентом Кромасил С-18, Alltima C18, снабженная предколонкой длиной 10 мм[1)].

[1)] Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является поддержкой указанного продукта.

6.4 Предколонка того же внутреннего диаметра и заполненная тем же обращенно-фазовым сорбентом, что и аналитическая колонка.

6.5 Испаритель ротационный, снабженный водяной баней с регулятором температуры в диапазоне от 20 °С до 50 °С.

6.6 Насос лабораторный вакуумный, мембранный или водоструйный по ГОСТ 25336, обеспечивающий разрежение от 2,5 до 10 кПа.

6.7 Устройство для перемешивания проб (шейкер), обеспечивающее частоту встряхивания до 120 мин$^{-1}$, по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

6.8 Шкаф сушильный, обеспечивающий температуру до 200 °С.

6.9 Измельчитель проб, обеспечивающий измельчение до частиц размером менее 1 мм, например лабораторная мельница по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

6.10 Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

6.11 Центрифуга лабораторная с частотой вращения не менее 5000 мин$^{-1}$.

6.12 Стандартный образец, принятый в соответствии с нормативными документами, действующими на территории государства, принявшего стандарт, состава раствора афлатоксина B_1 в ацетонитриле массовой концентрации 10 мкг/см^3 с погрешностью аттестованного значения не более ±0,5 мкг/см^3. Допускается применение стандартных образцов состава раствора афлатоксина B_1 в других растворителях с тем же или иным значением массовой концентрацией афлатоксина B_1, а также кристаллического афлатоксина B_1 с массовой долей основного вещества не менее 98 %, что должно быть учтено при приготовлении исходного раствора по 8.3.2.

6.13 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

6.14 Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, оптическая плотность относительно дистиллированной воды при 200 нм не более 0,025, массовая доля воды не более 0,03 %.

6.15 Кислота серная по ГОСТ 4204, х. ч. или ч. д. а.

6.16 Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.

6.17 Кислота трифторуксусная с массовой долей основного вещества не менее 98 % по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

6.18 Гексан, х. ч., по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

6.19 Алюминия оксид для хроматографии нейтральный или щелочной, фракция от 50 до 150 мкм по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

6.20 Натрий углекислый 10-водный по ГОСТ 84, х. ч. или ч. д. а.

6.21 Пипетки градуированные 1-2-2-1, 1-2-2-2, 1-2-2-5, 1-2-2-10 или других типов и исполнений по ГОСТ 29227.

6.22 Цилиндры мерные 1-10-2, 1-25-2, 1-50-2, 1-250-2 или других исполнений по ГОСТ 1770.

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

6.24 Пробирки одноразовые (типа Эппендорф) вместимостью 1,5 см^3.

6.25 Дозаторы переменного объема от 100 до 1000 мм^3 с метрологическими характеристиками, соответствующими ГОСТ 28311.

6.26 Колбы остродонные О-10-14/23, О-25-14/23 и О-50-14/23 по ГОСТ 25336.

6.27 Колбы плоскодонные П-1-50-29/32, П-1-100-29/32, П-1-250-29/32, П-1-500-29/32, П-1-1000-29/32 или Кн-1-50-29/32, Кн-1-100-29/32, Кн-1-250-29/32, Кн-1-500-29/32, Кн-1-1000-29/32 по ГОСТ 25336.

6.28 Воронки делительные типа ВД исполнений 1 или 3 вместимостью 50 см^3 по ГОСТ 25336 (применяются при испытаниях масложировой продукции).

6.29 Воронки лабораторные типа В по ГОСТ 25336.

6.30 Колонка хроматографическая стеклянная с пришлифованной пробкой (длина 20 см, внутренний диаметр 10 мм)

6.31 Фильтры бумажные «красная лента» по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

6.32 Стеклянные емкости вместимостью 250, 1000 см^3 с пришлифованными стеклянными, фторопластовыми или полиэтиленовыми пробками по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

6.33 Часы песочные или таймер по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

6.34 Вата медицинская по ГОСТ 5556.

6.35 Спектрофотометр, обеспечивающий измерения оптической плотности в диапазоне от 340 до 400 нм с погрешностью не более ±1 % (требуется только при приготовлении исходного раствора афлатоксина B_1 из кристаллического препарата согласно 8.3.2).

6.36 Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками не хуже вышеуказанных, вспомогательного оборудования и материалов с техническими характеристиками не хуже вышеуказанных, а также химических реактивов аналогичной или более высокой квалификации.

7 Условия проведения испытаний

При подготовке к проведению испытаний и проведении испытаний в лаборатории соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха . . . . . (20 ± 5) °С;
- атмосферное давление . . . . . от 84,0 до 106,7 кПа;
- влажность воздуха . . . . . не более 80 % при 25 °С.

В лабораторных помещениях не должно быть загрязненности воздуха рабочей зоны пылью и агрессивными веществами, должны отсутствовать вибрация или другие факторы, влияющие на результаты испытаний.

8 Подготовка к проведению испытаний

8.1 Подготовка стеклянной посуды

Посуду для приготовления и хранения подвижной фазы моют только серной кислотой по 6.15 без применения других моющих средств, тщательно промывают водопроводной водой и ополаскивают дистиллированной водой.

Остальную стеклянную посуду моют горячей водой с моющим средством, тщательно ополаскивают дистиллированной водой и сушат в сушильном шкафу при температуре 105 °С.

8.2 Приготовление вспомогательных растворов

8.2.1 Приготовление подвижной фазы ацетонитрил — дистиллированная вода в объемном соотношении 23:77

В коническую или плоскодонную колбу вместимостью 500 см³ помещают 115 см³ ацетонитрила и 385 см³ дистиллированной воды. Смесь тщательно перемешивают.

При хранении подвижной фазы недопустимо использование резиновых и корковых пробок.

Срок хранения подвижной фазы при комнатной температуре в стеклянной емкости с пришлифованной стеклянной, фторопластовой или полиэтиленовой пробкой — не более 3 мес.

Перед использованием подвижную фазу дегазируют и фильтруют в соответствии с указаниями изготовителя хроматографа и(или) колонки.

Примечания

1 В зависимости от типа сорбента и типоразмера применяемых колонок допускается варьирование состава подвижной фазы в диапазоне объемной доли ацетонитрила от 20 % до 25 % с целью оптимизации отделения пика афлатоксина B_1 от пиков компонентов матрицы пробы. Рекомендации по оптимизации состава подвижной фазы приведены в приложении Б.

2 При наличии технической возможности допускается использование градиентной техники элюирования. Состав подвижных фаз и программу элюирования оптимизируют в соответствии с рекомендациями изготовителя колонок. Например, для колонок по 6.3 рекомендуется следующий режим: объемная доля ацетонитрила, % (время, мин) — 15 (0)—15 (2)—40 (19)—40 (24).

8.2.2 Приготовление смеси ацетонитрила и дистиллированной воды в объемном соотношении 9:1

В плоскодонную или коническую колбу вместимостью 250 см³ помещают 180 см³ ацетонитрила и 20 см³ дистиллированной воды. Смесь тщательно перемешивают.

Срок хранения смеси при комнатной температуре в стеклянной емкости с пришлифованной стеклянной, фторопластовой или полиэтиленовой пробкой — 3 мес.

8.2.3 Приготовление раствора хлорида натрия с массовой концентрацией 40 г/дм³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 4,0 г хлорида натрия, добавляют 30—50 см³ дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения. Доводят объем дистиллированной водой до метки и снова перемешивают.

Срок хранения при комнатной температуре — 3 мес.

8.3 Приготовление растворов афлатоксина B_1

8.3.1 Общие положения

Растворы афлатоксина B_1 должны храниться в темноте при температуре не выше 6 °С в стеклянных сосудах с фторопластовыми или пришлифованными стеклянными пробками.

8.3.2 Приготовление исходного раствора афлатоксина B_1 с номинальным значением массовой концентрации 50 нг/см³

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают пипеткой или дозатором 0,5 см³ стандартного образца состава раствора афлатоксина B_1 номинального значения массовой концентрации 10 мкг/см³ (6.12) и доводят до метки ацетонитрилом (6.14).

Срок хранения исходного раствора в холодильнике при температуре от 2 °С до 6 °С — не более 6 мес. Рекомендуется использовать сосуды из темного стекла, а сосуды из бесцветного стекла заворачивать в материалы, не пропускающие свет (например, алюминиевую фольгу).

Фактическое значение массовой концентрации афлатоксина B_1 в исходном растворе ($C_{исх}$, нг/см³) вычисляют по формуле

$$C_{исх} = \frac{C_{СО} \cdot V_{СО}}{V_{исх}} \cdot 1000, \quad (1)$$

где $C_{СО}$ — значение массовой концентрации афлатоксина B_1 в стандартном образце, мкг/см³;

$V_{СО}$ — объем стандартного образца состава раствора афлатоксина B_1, отобранный для приготовления исходного раствора, см³ (0,5 см³);

$V_{исх}$ — объем приготовленного исходного раствора, см³ (100 см³);

1000 — коэффициент согласования размерности единиц массы.

Примечания

1 При использовании стандартного образца состава раствора афлатоксина B_1 в других растворителях аликвоту (0,5 см³) упаривают до сухого остатка в вакууме при температуре водяной бани от 40 °С до 45 °С. Сухой остаток растворяют в ацетонитриле и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и разбавляют до метки ацетонитрилом.

2 При использовании стандартных образцов с иным номинальным значением массовой концентрации афлатоксина B_1 изменяют объем аликвоты и (или) мерной колбы таким образом, чтобы номинальное значение массовой концентрации афлатоксина B_1 в приготовленном исходном растворе составляло 50 нг/см³.

При использовании кристаллического препарата афлатоксина B_1 приготовление раствора и расчет значения массовой концентрации афлатоксина B_1 в растворе проводят в соответствии с приложением В.

8.3.3 Приготовление градуировочных растворов афлатоксина B_1

В колбу для упаривания помещают пипеткой или дозатором указанный в таблице 1 объем раствора афлатоксина B_1 номинального значения массовой концентрации 50 нг/см³ (8.3.2), удаляют растворитель упариванием в вакууме при температуре водяной бани от 40 до 45 °С.

К сухому остатку добавляют 50 мм³ трифторуксусной кислоты, тщательно перемешивают, выдерживают 10 мин в колбе, закрытой стеклянной пришлифованной пробкой. Затем остаток ТФУ отгоняют в вакууме досуха до исчезновения ее запаха, растворяют сухой остаток в соответствующем объеме (см. таблицу 1) подвижной фазы по 8.2.1, перемешивают и выдерживают перед измерениями не менее 10 мин в закрытом сосуде.

Таблица 1

Номер градуировочного раствора	Номинальное значение массовой концентрации афлатоксина B_1, нг/см³	Объем раствора афлатоксина B_1 (8.3.2), $V_{исх}$, см³	Объем подвижной фазы, добавляемый к сухому остатку, $V_{гр.ф}$, см³
1	50	1	1
2	10	0,2	1
3	1	0,2	10

Растворы готовят в день проведения градуировки хроматографа.

Фактические значения массовой концентрации афлатоксина B_1 в приготовленных градуировочных растворах ($C_{гр,i}$, нг/см^3) вычисляют по формуле

$$C_{гр,i} = \frac{C_{исх} \cdot V_{исх}}{V_{гр,i}}, \quad (2)$$

где $C_{исх}$ — фактическое значение массовой концентрации афлатоксина B_1 в растворе по 8.3.2, нг/см^3;
$V_{исх}$ — объем раствора по 8.3.2, взятый для приготовления раствора, см^3;
$V_{гр,i}$ — объем подвижной фазы (таблица 1), см^3;
i — номер градуировочного раствора по таблице 1.

Примечание — Допускается использование иных градуировочных растворов в диапазоне значений массовой концентрации афлатоксина B_1 от 1 до 50 нг/см^3.

8.3.4 Приготовление контрольного раствора афлатоксина B_1

Контрольный раствор афлатоксина B_1 в подвижной фазе готовят согласно 8.3.3, используя аликвоту 0,4 см^3 раствора афлатоксина B_1 в ацетонитриле номинального значения массовой концентрации 50 нг/см^3 (8.3.2) и растворяя остаток после упаривания в 1 см^3 подвижной фазы по 8.2.1.

Номинальное значение массовой концентрации афлатоксина B_1 в контрольном растворе составляет 20 нг/см^3, фактическое значение вычисляют по формуле (2).

Используют только свежеприготовленный раствор.

8.4 Подготовка хроматографа

Подготовку хроматографа к измерениям проводят в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации.

Устанавливают рабочие длины волн возбуждения и регистрации флуоресценции (6.1), а также скорость подачи подвижной фазы (8.5). При наличии термостата колонок устанавливают температуру (25 ± 1) °С.

При использовании градиентного элюирования задают соответствующую программу.

8.5 Условия хроматографического анализа

Если используют хроматографическую колонку по 6.3 и подвижную фазу по 8.2.1, то хроматографический анализ проводят в следующих условиях:

- длина волны возбуждения флуоресценции . . . . . 365 нм;
- длина волны регистрации флуоресценции . . . . . 440 нм;
- скорость потока подвижной фазы. . . . . 150 мм^3/мин;
- объем дозирования . . . . . 20 мм^3;
- температура термостата колонки (при его наличии) . . . . . (25 ± 1) °С.

При использовании колонок других типоразмеров скорость потока подвижной фазы и объем дозирования выбирают в соответствии с указаниями изготовителей хроматографа и колонки.

8.6 Градуировка хроматографа

Диапазон линейности градуировочной характеристики составляет от 1 до 50 нг/см^3. В качестве образцов для градуировки хроматографа используют градуировочные растворы афлатоксина B_1 по 8.3.3.

Регистрируют по две хроматограммы каждого градуировочного раствора и, используя программное обеспечение к хроматографу, проводят градуировку хроматографа, устанавливая параметры градуировочной характеристики и время удерживания афлатоксина B_1.

Рассчитывают коэффициент корреляции и отклонения рассчитанных значений массовой концентрации афлатоксина B_1 в каждой градуировочной точке от фактического значения в соответствии с процедурой приготовления градуировочных растворов (8.3.3).

Градуировку считают приемлемой, если:

- коэффициент корреляции не менее 0,998;
- относительное отклонение рассчитанного значения массовой концентрации афлатоксина B_1 от фактического значения в каждой градуировочной точке не более 10 %.

8.7 Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят ежедневно перед началом работы.

В качестве контрольного раствора используют свежеприготовленный контрольный раствор (8.3.4).

Регистрируют не менее двух хроматограмм контрольного раствора и идентифицируют пик афлатоксина B_1 по времени удерживания при ширине окна идентификации 5 %, внося при необходимости программную коррекцию времени удерживания пика, и при помощи градуировочной характеристики рассчитывают массовую концентрацию афлатоксина B_1 для каждой хроматограммы.

Сходимость значений времени удерживания и значений массовой концентрации афлатоксина B_1 проверяют по формулам

$$\frac{|t_1 - t_2|}{\bar{t}} \le 0{,}05, \quad (3)$$

где t_1 и t_2 — время удерживания пика афлатоксина B_1 на первой и второй хроматограммах соответственно, мин;

$\bar{t}$ — среднеарифметическое значений t_1 и t_2, мин.

$$\frac{|C_{к1} - C_{к2}|}{\bar{C}_к} \le 0{,}07, \quad (4)$$

где $C_{к1}$ и $C_{к2}$ — массовые концентрации афлатоксина B_1 в контрольном растворе по первой и второй хроматограммам соответственно, нг/см^3;

$\bar{C}_к$ — среднеарифметическое значений $C_{к1}$ и $C_{к2}$, нг/см^3.

Градуировочная зависимость признается стабильной, если выполняется условие

$$\frac{|\bar{C}_к - C_{к,0}|}{C_{к,0}} \le 0{,}12, \quad (5)$$

где $C_{к,0}$ — фактическое значение массовой концентрации афлатоксина B_1 в контрольном растворе, нг/см^3.

Если условие (5) не выполняется, то процедуру контроля повторяют, заново приготавливая контрольный раствор по 8.3.4. Результаты повторного контроля считают окончательными и градуировку хроматографа по 8.6 проводят заново.

8.8 Контроль холостой реактивной пробы

Контроль холостой реактивной пробы проводят для каждой партии реактивов перед испытанием проб.

Холостую реактивную пробу готовят по 9.1—9.3 (в зависимости от типа проб), не добавляя анализируемую пробу.

Проводят хроматографический анализ полученного концентрата холостой реактивной пробы по 9.5. Если на хроматограмме присутствуют пики, по параметрам удерживания близкие к пику афлатоксина B_1, то находят и устраняют причины загрязнения холостой пробы (посуда или реактивы) и контроль повторяют.

8.9 Подготовка хроматографической колонки

В носик колонки помещают небольшое количество ваты (6.34). Взвешивают 2 г оксида алюминия (6.19) и переносят в колонку, затем сверху насыпают 1 г натрия углекислого 10-водного (6.20). Колонку используют однократно.

8.10 Учет потерь афлатоксина B_1 при подготовке проб

Для учета потерь афлатоксина B_1 при подготовке проб проводят анализ проб продукции с введенной добавкой афлатоксина B_1. Пробы, в которые вносят добавки, не должны содержать афлатоксин B_1.

К пробе массой от 4,5 до 5,5 г добавляют 0,5 см^3 (0,25 см^3 в случае анализа проб масложировой продукции) раствора афлатоксина B_1 номинального значения массовой концентрации 50 нг/см^3 по 8.3.2 и проводят все операции согласно 9.1—9.3 (в зависимости от типа проб), получая таким образом концентрат пробы, который анализируют согласно 9.5.

Находят массовую концентрацию афлатоксина B_1 в концентрате пробы и вычисляют коэффициент извлечения афлатоксина B_1 (η) по формуле

$$\eta = \frac{V_1 \cdot V_3 \cdot C_{изм}}{V_2 \cdot C_{ст} \cdot V_{ст}}, \quad (6)$$

где V_1 — объем смеси ацетонитрил — вода, использованной для извлечения афлатоксина B_1, см^3 (25 см^3 при подготовке пробы по 9.1 и 21 см^3 при подготовке пробы по 9.2);

V_3 — объем концентрата пробы по 9.4, см^3 (1 см^3);

$C_{изм}$ — измеренное значение массовой концентрации афлатоксина B_1 в концентрате пробы с добавкой, нг/см³;

V_2 — объем аликвоты фильтрата пробы, отобранной для проведения очистки по 9.3, см³ (10 см³);

$C_{ст}$ — массовая концентрация раствора афлатоксина B_1, взятого для внесения добавки, нг/см³;

$V_{ст}$ — объем раствора афлатоксина B_1, взятого для внесения добавки, см³ (по 9.1—0,5 см³, по 9.2—0,25 см³).

Коэффициент извлечения афлатоксина B_1 определяют не менее двух раз на стадии освоения методики и затем при смене партий реактивов. Полученные значения должны соответствовать следующим требованиям:

- каждое из полученных значений находится в интервале от 0,5 до 1,0;
- относительное значение размаха полученных значений соответствует условию

$$\frac{|\eta_{max} - \eta_{min}|}{\overline{\eta}} \le 0{,}10, \quad (7)$$

где η_{max} и η_{min} — наибольшее и наименьшее из полученных значений коэффициента извлечения афлатоксина B_1;

$\overline{\eta}$ — среднеарифметическое полученных значений коэффициента извлечения афлатоксина B_1.

Если оба этих условия выполняются, то среднеарифметическое значений коэффициента извлечения афлатоксина B_1 ($\overline{\eta}$) используют при расчете результатов испытаний по формуле (9). В противном случае находят причины потерь афлатоксина B_1 и повторяют определение коэффициента извлечения.

Примечания

1 Коэффициент извлечения афлатоксина B_1 зависит от матрицы пробы.

2 В случае низкого коэффициента извлечения (менее 0,5) рекомендуется провести операции, изложенные в настоящем пункте, без добавления пробы продукции. Коэффициент извлечения афлатоксина B_1 в этом случае должен составлять от 0,8 до 1,0. При более низких значениях находят и устраняют причины недопустимых потерь афлатоксина B_1, наиболее вероятной причиной которых может быть неудовлетворительное качество карбоната натрия.

9 Проведение испытаний

9.1 Экстракция афлатоксина B_1 из проб зерна и продуктов его переработки, кормов и сырья для их производства, а также орехов, чая, шоколада, какао

В коническую или плоскодонную колбу вместимостью 100 см³ помещают от 4,5 до 5,5 г измельченной пробы, 1 г хлористого натрия и 25 см³ (V_1, см³) смеси ацетонитрил — вода по 8.2.2. После перемешивания в течение 30 мин полученную смесь оставляют на 1—2 мин в покое, затем пропускают через бумажный фильтр «красная лента» и отбирают 10 см³ (V_2, см³) фильтрата. Подготовленную аликвотную порцию экстракта пробы очищают по 9.3.

9.2 Экстракция афлатоксина B_1 из проб масложировой продукции

В коническую колбу вместимостью 100 см³ помещают от 2,2 до 2,8 г пробы, добавляют 5 см³ гексана, 1 см³ раствора хлорида натрия массовой концентрации 40 г/дм³ и 20 см³ ацетонитрила (общий объем водно-ацетонитрильного раствора V_1, см³, равен 21 см³). Перемешивают 30 мин. Смесь переносят в делительную воронку вместимостью 50—100 см³, добавляют 5 см³ гексана и проводят экстракцию жиров в течение 1 мин. Нижний водно-ацетонитрильный слой пропускают через бумажный фильтр «красная лента» и отбирают 10 см³ (V_2, см³) фильтрата. Подготовленную аликвотную порцию экстракта пробы очищают по 9.3.

9.3 Очистка фильтрата

Аликвоту фильтрата пробы (см. 9.1 и 9.2) пропускают через колонку с оксидом алюминия, подготовленную по 8.9, и собирают в остродонную колбу вместимостью 25 см³. Промывают колонку 5 см³ ацетонитрила, собирая его в ту же колбу. Содержимое колбы упаривают в вакууме досуха.

9.4 Подготовка концентрата пробы

К сухому остатку, полученному по 9.3, добавляют 50 мм³ ТФУ, тщательно омывают дно колбы, закрывают стеклянной пришлифованной пробкой и выдерживают 10 мин. Остаток ТФУ отгоняют в вакууме досуха до исчезновения ее характерного запаха, сухой остаток растворяют в 1 см³ (V_3, см³) подвижной фазы, перемешивают, закрывают стеклянной пришлифованной пробкой и выдерживают не менее 10 мин. Допускается растворять сухой остаток в ином объеме подвижной фазы (от 0,4 до 5,0 см³) в зависимости от ожидаемой концентрации афлатоксина B_1.

Затем к полученному концентрату добавляют 2 см³ гексана, добиваясь перехода маслообразного остатка в гексан. Выдерживают 5 мин и аккуратно отбирают нижний слой, используя для этого пипетку или дозатор, в подходящий сосуд, например в одноразовую пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 см³ (6.24). Полученный концентрат подвергают хроматографическому анализу до конца рабочего дня согласно 9.5.

9.5 Проведение хроматографических измерений

Регистрируют две хроматограммы концентрата пробы (по 9.4) в тех же условиях, при которых была проведена градуировка хроматографа (по 8.6). Идентификацию афлатоксина B_1 проводят по совпадению времени удерживания афлатоксина B_1 в экстракте пробы с его временем удерживания, полученным при контроле стабильности градуировочной характеристики, установив ширину окна идентификации 5 %.

Пример хроматограммы приведен на рисунке Б.1 (приложение Б).

Примечание — При необходимости подтверждения правильности идентификации пика афлатоксина B_1 рекомендуется выполнить добавку раствора афлатоксина B_1 по 8.3.3 к концентрату пробы. О достоверности идентификации можно судить по увеличению высоты предполагаемого пика афлатоксина B_1. Количество добавляемого раствора афлатоксина B_1 определяют исходя из того, что массовая концентрация афлатоксина B_1 в пробе должна увеличиться на 50 %—150 % по сравнению с исходным значением.

При наличии на хроматограмме концентрата пробы пика, идентифицированного как пик афлатоксина B_1, вычисляют значение массовой концентрации афлатоксина B_1 в концентрате пробы для каждой зарегистрированной хроматограммы с использованием градуировочной характеристики, установленной по 8.6, и проверяют приемлемость полученных значений, используя условие (4).

Если условие (4) выполняется, то в качестве результата измерений массовой концентрации афлатоксина B_1 в концентрате испытуемой пробы ($C_{кон}$, нг/см³) принимают среднеарифметическое полученных значений. Если условие (4) не выполняется, то находят и устраняют причины нестабильности, после чего ввод концентрата пробы повторяют.

Если массовая концентрация афлатоксина B_1 в концентрате превышает 50 нг/см³, то концентрат разбавляют подвижной фазой (8.2.1). Коэффициент разбавления (Q) вычисляют по формуле

$$Q = \frac{V_p}{V_a}, \tag{8}$$

где V_p — объем концентрата пробы, полученного в результате разбавления, см³;

V_a — объем аликвотной порции исходного концентрата пробы, взятый для разбавления, см³.

10 Обработка результатов испытаний

Массовую долю афлатоксина B_1 в пробе X, млн⁻¹, вычисляют по формуле

$$X = \frac{V_1 \cdot V_3 \cdot C_{кон}}{1000 \cdot V_2 \cdot m \cdot \eta} \cdot Q, \tag{9}$$

где V_1 — объем смеси ацетонитрил — вода, использованной для извлечения афлатоксина B_1 по 9.1 или 9.2, см³ (25 см³ при подготовке пробы по 9.1 и 21 см³ при подготовке пробы по 9.2);

V_3 — объем концентрата пробы по 9.4, см³;

$C_{кон}$ — массовая концентрация афлатоксина B_1 в концентрате пробы (см. 9.5), нг/см³;

1000 — коэффициент согласования размерности единиц массы;

V_2 — объем аликвоты фильтрата пробы, отобранной для проведения очистки по 9.3, см³ (10 см³);

m — масса пробы, г;

η — коэффициент извлечения афлатоксина B_1 по 8.10;

Q — коэффициент разбавления концентрата пробы по 9.5. Если концентрат пробы не разбавляли, то $Q = 1$.

11 Метрологические характеристики

Метод обеспечивает получение результатов измерений с метрологическими характеристиками, не превышающими значений, приведенных в таблице 2.

Таблица 2

Диапазон измерений, млн$^{-1}$	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в условиях повторяемости при P = 0,95) $r_{отн}$, %	Критическая разность (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в условиях воспроизводимости при P = 0,95) $CD_{0,95,\ отн}$, %	Показатель точности (границы* относительной погрешности при P = 0,95), $\pm\ \delta$, %
от 0,0002 до 0,0025 включ.	31	59	42
свыше 0,0025 >> 0,05 >>	20	36	26
* Установленные числовые значения границ относительной погрешности соответствуют числовым значениям относительной расширенной неопределенности $U_{отн}$ при коэффициенте охвата k = 2.			

Расхождение между двумя результатами измерений (X_1 и X_2, млн$^{-1}$), полученными в одной лаборатории в условиях повторяемости, должно соответствовать условию

$$\frac{|X_1 - X_2|}{\overline{X}} \cdot 100 \le r_{отн}, \qquad (10)$$

где $\overline{X}$ — среднеарифметическое значений X_1 и X_2, млн$^{-1}$;

$r_{отн}$ — предел повторяемости (таблица 2), %.

При выполнении условия (10) за результат измерений принимают среднеарифметическое полученных результатов измерений, млн$^{-1}$.

Расхождение между двумя результатами измерений, полученными в двух лабораториях ($\overline{X}_{1лаб}$ и $\overline{X}_{2лаб}$, млн$^{-1}$) на идентичных пробах, должно соответствовать условию

$$\frac{|\overline{X}_{1лаб} - \overline{X}_{2лаб}|}{\overline{X}_{лаб}} \cdot 100 \le CD_{0,95,\ отн}, \qquad (11)$$

где $\overline{X}_{лаб}$ — среднеарифметическое значение $\overline{X}_{1лаб}$ и $\overline{X}_{2лаб}$, млн$^{-1}$;

$CD_{0,95,отн}$ — критическая разность (таблица 2), %.

12 Контроль качества результатов измерений

Контроль показателей качества результатов измерений в лаборатории предусматривает проведение контроля стабильности результатов измерений с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-6 (раздел 6).

13 Оформление результатов испытаний

Результаты испытаний регистрируют в протоколе испытаний, который оформляют в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025, при этом протокол испытаний должен содержать ссылку на настоящий стандарт.

Результаты измерений массовой доли афлатоксина B_1 (при подтвержденном в лаборатории соответствии аналитической процедуры требованиям настоящего стандарта) представляют в виде

$$X \pm \Delta \quad \text{либо} \quad \overline{X} \pm U, \qquad (12)$$

где $\overline{X}$ — результат измерений, полученный в соответствии с разделом 10, млн$^{-1}$;

Δ — границы абсолютной погрешности измерений массовой доли афлатоксина B_1 (P = 0,95), млн$^{-1}$, которые вычисляют по формуле

$$\Delta = 0{,}01 \cdot \delta \cdot \overline{X}; \qquad (13)$$

U — расширенная неопределенность при коэффициенте охвата k = 2, млн$^{-1}$, которую вычисляют по формуле

$$U = 0{,}01 \cdot U_{отн} \cdot \overline{X}. \qquad (14)$$

Значения $\delta(U_{отн})$ приведены в таблице 2.

Числовые значения границ абсолютной погрешности (неопределенности) выражают числом, содержащим не более двух значащих цифр, при этом наименьший разряд числового значения окончательного результата измерений принимают таким же, как и наименьший разряд числового значения границ абсолютной погрешности (неопределенности).

Результат испытаний при содержании афлатоксина B_1 менее нижней границы диапазона измерений (см. таблицу 2) представляют в виде «менее 0,0002 млн$^{-1}$». Результат испытаний при содержании афлатоксина B_1 выше верхней границы диапазона измерений (см. таблицу 2) представляют в виде «более 0,05 млн$^{-1}$».

Приложение А
(рекомендуемое)

Требования безопасности при работе с афлатоксинами

Работу с афлатоксинами проводят в отдельной комнате или в общем помещении химической лаборатории при наличии боксового отделения или настольного бокса.

В лабораторных помещениях, где ведутся работы с афлатоксинами, запрещается курить и принимать пищу.

Стандартные образцы и растворы афлатоксинов следует хранить в местах, недоступных для посторонних. Сосуды с растворами афлатоксинов должны быть снабжены этикетками с надписью «ЯД» и находиться в стаканах на поддонах. Рабочее место должно быть покрыто листом фильтровальной бумаги, которую после работы следует поместить в герметичный мешок или контейнер для последующего сжигания.

Химическую посуду, находившуюся в контакте с афлатоксинами, обрабатывают путем ее заполнения на 2—3 час деконтаминационным раствором следующего состава: 250 г гидроксида натрия, 100 г хлорамина Б, 10 г стирального порошка, 5 $дм^3$ воды. После этого посуду моют общепринятым способом.

Работать с афлатоксинами следует в резиновых перчатках, которые после завершения работы должны быть обработаны раствором хлорамина Б и затем тщательно промыты проточной водой.

В случае попадания афлатоксинов на лабораторное оборудование и предметы их деконтаминацию следует производить тщательной обработкой 5—10 %-ным водным раствором хлорамина Б, а затем 1 %-ным водным раствором углекислого кислого натрия.

При попадании афлатоксинов на открытые участки тела, в глаза, на слизистую рта и носа необходимо немедленно промыть пораженные участки 1 %-ным водным раствором борной кислоты, а затем большим количеством проточной воды.

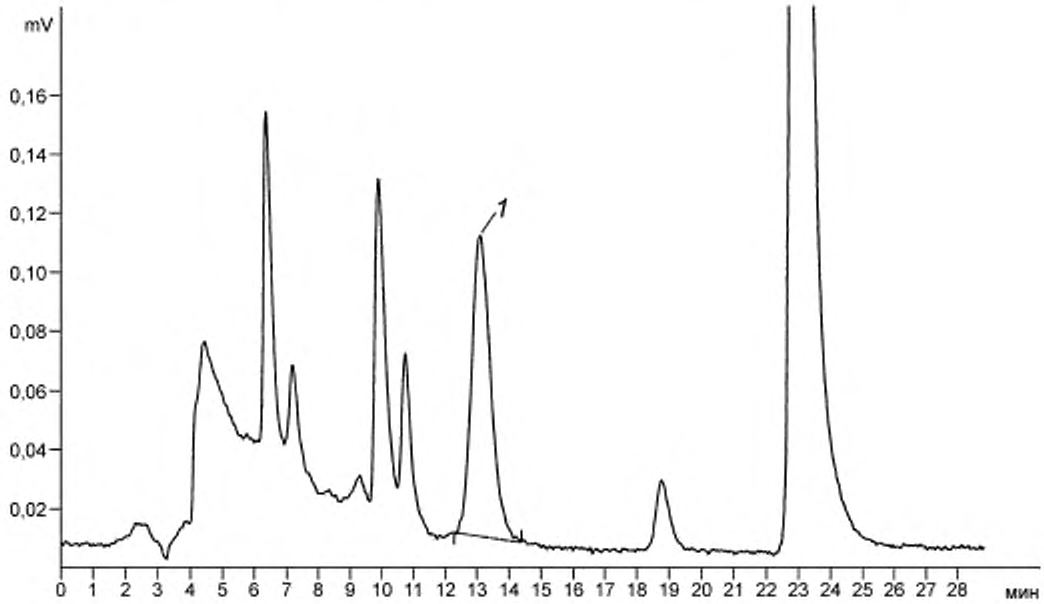
Приложение Б
(рекомендуемое)

Оптимизация состава подвижной фазы

В зависимости от типа сорбента и типоразмера используемых колонок допускается варьирование объемной доли ацетонитрила в подвижной фазе в диапазоне от 20 до 25 %. В качестве пробы рекомендуется использовать нерафинированное растительное масло, в котором влияние матричных компонентов наиболее значимо. Критерием оптимизации состава подвижной фазы является отделение пика афлатоксина B_1 от пиков матричных компонентов пробы.

Пробы масла и масла с добавкой (см. 8.10) анализируют по 9.2—9.5, используя выбранный состав подвижной фазы, и убеждаются, что пик афлатоксина B_1 отделяется от пиков матричных компонентов пробы (разрешение ≥ 1).

Профиль хроматограммы растительного масла с добавкой афлатоксина B_1 представлен на рисунке Б.1.



1 — Пик афлатоксина B_1

Рисунок Б.1 — Хроматограмма нерафинированного растительного масла с добавкой афлатоксина B_1

Приложение В
(рекомендуемое)

Приготовление раствора афлатоксина B_1 из кристаллического препарата

1 мг кристаллического афлатоксина B_1 количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, растворяют в ацетонитриле и доводят ацетонитрилом до метки.

Измеряют оптическую плотность приготовленного раствора в области длин волн от 345 до 365 нм с шагом 1 нм на спектрофотометре (6.35) в кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см относительно ацетонитрила и находят ее максимальное значение в указанном диапазоне длин волн.

Рассчитывают значение массовой концентрации исходного раствора C_0, мкг/$см^3$, по формуле

$$C_0 = \frac{A \cdot M \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l}, \qquad (B.1)$$

где A — оптическая плотность раствора, ед. оптической плотности;

M — молярная масса афлатоксина B_1, г/моль (M = 312,3 г/моль);

1000 — коэффициент согласования размерности единиц массы,

ε — молярный коэффициент поглощения раствора афлатоксина B_1, $дм^3 \cdot моль^{-1} \cdot см^{-1}$ ($\varepsilon = 2{,}07 \cdot 10^4$ $дм^3 \cdot моль^{-1} \cdot см^{-1}$);

l — толщина поглощающего слоя, см (l = 1 см).

Номинальное значение массовой концентрации афлатоксина B_1 в приготовленном растворе составляет 10 мкг/$см^3$. Этот раствор используется для приготовления исходного раствора афлатоксина B_1 по 8.3.2. При вычислении фактического значения массовой концентрации приготовленного раствора по формуле (1) вместо C_{CO} используют значение C_0, рассчитанное по формуле (В.1).

УДК 664:543.544.5.068.7:006.354

МКС 67.050
65.120

Ключевые слова: пищевые продукты, продовольственное сырье, корма, комбикорма, определение содержания, высокоэффективная жидкостная хроматография, афлатоксин B_1, очистка на оксиде алюминия, флуориметрическое детектирование

Редактор *К.В. Дудко*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Е.Д. Дульнева*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 30.05.2016. Подписано в печать 06.06.2016. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,86. Тираж 39 экз. Зак. 1418.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru