ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ЕН 15829— 2011

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение охратоксина А в коринке, изюме, кишмише, смесях сушеных фруктов и инжире сушеном. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и детектирования по флюоресценции

EN 15829:2010
Foodstuffs — Determination of ochratoxin A in currants, raisins, sultanas, mixed dried fruit and dried figs — HPLC method with immunoaffinity column cleanup and fluorescence detection (IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2015

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт 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 Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 17 октября 2011 г. № 457-ст

4 Настоящий стандарт идентичен европейскому региональному стандарту ЕН 15829:2010 «Продукты пищевые. Определение охратоксина А в коринке, изюме, кишмише, смешанных сушеных фруктах и инжире сушеном. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и детектирования по флюоресценции» (EN 15829:2010 «Foodstuffs — Determination of ochratoxin A in currants, raisins, sultanas, mixed dried fruit and dried figs — HPLC method with immunoaffinity column cleanup and fluorescence detection»).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочного регионального стандарта соответствующий ему национальный стандарт Российской Федерации, сведения о котором приведены в дополнительном приложении ДА

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «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.ru)

© Стандартинформ, 2015

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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Сущность метода 1
4 Реактивы 2
5 Аппаратура 4
6 Процедура проведения испытания 5
7 Анализ с помощью ВЭЖХ 6
8 Обработка результатов 7
9 Прецизионность 7
10 Протокол результатов испытаний 7
Приложение А (справочное) Типичная хроматограмма 9
Приложение В (справочное) Данные по прецизионности методики 10
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочного европейского регионального стандарта ссылочному национальному стандарту Российской Федерации 11
Библиография 12

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение охратоксина А в коринке, изюме, кишмише, смесях сушеных фруктов и инжире сушеном. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта и детектирования по флюоресценции

Foodstuffs. Determination of ochratoxin A in currants, raisins, sultanas, mixed dried fruit and dried figs. High performance liquid chromatographic (HPLC) method with immunoaffinity column cleanup and fluorescence detection

Дата введения — 2013—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения охратоксина А в коринке, изюме, кишмише, смесях сушеных фруктов и сушеном инжире с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением очистки экстракта на колонке с иммуноаффинным сорбентом и детектированием по флюоресценции. Метод прошел валидацию путем межлабораторных испытаний проб, загрязненных охратоксином А естественным и искусственным образом в диапазоне содержания от 1,1 до 11 мг/кг.

Подробная информация о валидации метода приведена в разделе 9 и в приложении В.

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.

ЕН ИСО 3696 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний (ИСО 3696:1987) [EN ISO 3696, Water fov analytical laboratory use — Specifications and test methods (ISO 3696:1987]

3 Сущность метода

Анализируемую пробу экстрагируют смесью метанола и фосфорной кислоты. Экстракт фильтруют, разбавляют фосфатно-хлоридным буферным раствором и пропускают через колонку, заполненную иммуноаффинным сорбентом, содержащим антитела, специфичные к охратоксину А. При этом происходит сорбция, очистка и концентрирование охратоксина А, после чего охратоксин А элюируют с колонки. Количественное определение охратоксина А проводят с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением аналитической колонки с обращенно-фазовым сорбентом и детектирования по флюоресценции.

Издание официальное

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

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

4.2 Гелий газообразный очищенный сжатый.

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

4.4 Калий хлористый.

4.5 Калий фосфорнокислый однозамещенный.

4.6 Натрий хлористый.

4.7 Натрия гидроксид.

4.8 Аммония гидроксид, раствор молярной концентрации c (NH_4OH) = 1,1 моль/дм^3 для послеколоночного смещения значения pH элюента (применяется по выбору пользователя, см. 7.2).

Раствор готовят в день использования.

4.9 Кислота соляная, раствор массовой долей w (HCl) = 37 %.

4.10 Кислота фосфорная, раствор молярной концентрации c (H_3PO_4) = 0,1 моль/дм^3.

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

Раствор готовят разбавлением 8,28 см^3 раствора соляной кислоты по 4.9 водой до 1 дм^3.

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

Раствор готовят растворением 4 г гидроксида натрия по 4.7 в 1 дм^3 воды.

4.13 Раствор фосфатно-хлоридный буферный

Растворяют 8,0 г хлорида натрия по 4.6, 1,2 г безводного двухзамещенного фосфата натрия (или 2,9 г гидратированного двухзамещенного фосфата натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) по 4.3, 0,2 г однозамещенного фосфата калия по 4.5 и 0,2 г хлорида калия по 4.4 в 900 см^3 воды.

Значение pH приготовленного раствора доводят до 7,4 путем добавления раствора соляной кислоты по 4.11 либо раствора гидроксида натрия по 4.12, после чего объем раствора доводят водой до 1 дм^3. В качестве альтернативы допускается использовать имеющийся в продаже готовый раствор с аналогичными характеристиками.

4.14 Ацетонитрил.

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

4.15 Кислота уксусная ледяная массовой долей w (CH_3COOH) $\geq$ 98 %.

4.16 Метанол.

4.17 Толуол.

4.18 Растворитель для инжекций

Смешивают воду, ацетонитрил по 4.14 и уксусную кислоту по 4.15 в объемном соотношении 80 : 20 : 2.

4.19 Подвижная фаза для ВЭЖХ

Смешивают воду, ацетонитрил по 4.14 и ледяную уксусную кислоту по 4.15 в объемном соотношении 99 : 99 : 2. Полученную подвижную фазу дегазируют, например, с использованием гелия по 4.2.

4.20 Смешанный раствор толуола и уксусной кислоты

Смешивают толуол по 4.17 с ледяной уксусной кислотой по 4.15 в объемном соотношении 99 : 1.

4.21 Колонка с иммуноаффинным сорбентом

Колонка с иммуноаффинным сорбентом содержит антитела, специфичные в отношении охратоксина А. Для проведения испытания пригодна колонка сорбционной емкостью по отношению к охратоксину А не менее 100 нг, обеспечивающая открываемость не менее 70 % при внесении в нее 5 нг охратоксина А в растворе, состоящем из ацетонитрила по 4.14 и фосфатно-хлоридного буферного раствора по 4.13 в объемном соотношении 5 : 95.

4.22 Силанизирующий раствор для обработки внутренней поверхности лабораторной посуды (применяется по выбору пользователя)

Смешивают силанизирующий реактив с толуолом по 4.17 в объемном соотношении 1 : 19.

4.23 Охратоксин А, ампульный препарат в кристаллической или пленочной форме.

4.24 Охратоксин А, основной стандартный раствор

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.

Растворяют 1 мг охратоксина А или содержимое одной ампулы (при использовании ампульного препарата в пленочной форме) в смешанном растворе толуола и уксусной кислоты по 4.20, так, чтобы массовая концентрация охратоксина А в полученном растворе составляла 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 в кварцевой кювете длиной оптического пути 1 см с использованием спектрофотометра по 5.12. В качестве раствора сравнения используют смешанный растворитель по 4.20. По полученному спектру определяют длину волны, соответствующую максимальной оптической плотности. Массовую концентрацию охратоксина А, ρ_{ota}, мкг/см^3, рассчитывают по формуле

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

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 (М = 403,8 г/моль);

ε — молярный коэффициент поглощения охратоксина А в смешанном растворителе по 4.20, м^2/моль (в данном случае 544 м^2/моль [2]);

b — длина оптического пути кюветы, см.

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

4.25 Стандартный раствор охратоксина А промежуточной массовой концентрации для искусственного загрязнения проб при контроле полноты обнаружения

Аликвотную часть основного раствора по 4.24, содержащую 12,5 мкг охратоксина А, переносят в мерную колбу вместимостью 5 см^3. Содержимое колбы выпаривают досуха в токе азота при температуре не более 50 °С. Сухой остаток немедленно перерастворяют в метаноле по 4.16, объем содержимого в колбе доводят до метки метанолом. Массовая концентрация охратоксина А в полученном растворе составляет 2,5 мкг/см^3.

Полученный 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 основного раствора более 6 мес перед его использованием проверяют соответствие фактической массовой концентрации охратоксина А ранее установленному значению.

4.26 Стандартный раствор охратоксина А

Порцию раствора охратоксина А промежуточной концентрации по 4.25 объемом 500 мм^3 помещают в мерную колбу вместимостью 5 см^3, объем содержимого в колбе доводят до метки метанолом по 4.16. Массовая концентрация охратоксина А в полученном растворе составляет 0,25 мкг/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 6 мес.

5 Аппаратура

5.1 Общие положения

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

5.2 Стеклянные флаконы с силанизированной внутренней поверхностью (применяются по выбору пользователя)

Для подготовки флаконов их заполняют силанизирующим раствором по 4.22 и выдерживают в течение 1 мин. Далее флаконы промывают, используя сначала слабополярный растворитель, например толуол по 4.17, затем метанол по 4.16. Перед использованием флаконы высушивают.

Примечание — Применение силанизированной лабораторной посуды позволяет исключить возможность сорбции охратоксина А на стекле во время выпаривания раствора.

5.3 Блендер высокоскоростной или гомогенизатор.

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

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

5.6 Пипетки автоматические с регулируемым объемом дозирования вместимостью 1, 5, 10 см^3 и 200 мм^3, снабженные подходящими наконечниками

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

5.8 Резервуары и приспособления для установки иммуноаффинных колонок.

5.9 Насос вакуумный, обеспечивающий разрежение 1 кПа, производительностью 18 дм^3/мин.

5.10 Бумага фильтровальная с размером диаметра пор от 20 до 25 мкм.

5.11 Система для высокоэффективной жидкостной хроматографии в указанной ниже комплектации

5.11.1 Инжектор, обеспечивающий объем ввода 100 мм^3.

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

5.11.3 Термостат колонок (применяется по выбору пользователя), обеспечивающий постоянную температуру колонок независимо от колебаний температуры в лабораторном помещении (например, 45 °С с точностью установки ±1 °С и точностью поддержания заданной температуры ± 0,5 °С).

5.11.4 Колонка для ВЭЖХ аналитическая длиной 25 см, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная обращено-фазовым сорбентом, например, с привитыми октадецильными группами (ODS) диаметром частиц 5 мкм, обеспечивающая отделение пика охратоксина А от сопутствующих пиков. Перекрывание пика охратоксина А другими пиками не должно превышать 10 % его высоты. При необходимости для достижения приемлемой степени разделения пиков изменяют состав подвижной фазы. Для предотвращения потери работоспособности аналитической колонки рекомендуется использовать предколонку, заполненную обращено-фазовым сорбентом.

5.11.5 Дегазатор (применяется по выбору пользователя).

5.11.6 Детектор флюориметрический, снабженный проточной кюветой, позволяющий проводить измерения при длинах волн возбуждения и испускания соответственно 333 и 477 нм или, в случае использования системы послеколоночной дериватизации, соответственно 390 и 440 нм.

5.11.7 Самописец, интегратор или компьютерная система обработки данных.

5.11.8 Система для послеколоночной дериватизации (применяется по выбору пользователя), состоящая из безпульсационного изократического насоса, пригодного для создания скорости потока 0,3 см^3/мин, соединительного элемента для трех капилляров, имеющего нулевой мертвый объем, и

реактора в виде капилляра из нержавеющей стали или полиэфирэфиркетона (PEEK) длиной 1500 мм и размером внутреннего диаметра 0,25 мм.

5.12 Спектрофотометр, пригодный для измерений оптической плотности в ультрафиолетовой области спектра.

6 Процедура проведения испытания

6.1 Приготовление суспензии пробы

Измеряют массу лабораторной пробы. Для облегчения последующей гомогенизации рекомендуется предварительно измельчить лабораторную пробу до пастообразного состояния. К лабораторной пробе добавляют воду в соотношении 5 : 4 (по массе). Полученную смесь гомогенизируют не менее 30 мин или до получения массы однородной консистенции.

В случае если суспендированная проба хранилась в замороженном состоянии, перед взятием порции пробы для анализа ее полностью размораживают и тщательно перемешивают.

6.2 Экстракция

Порцию суспендированной пробы массой 45 г, измеренной с точностью до 0,2 г, помещают в стакан. В стакан добавляют 50 $см^3$ метанола по 4.16 и 5 $см^3$ раствора фосфорной кислоты по 4.10. Содержимое стакана гомогенизируют в течение 3—4 мин. Полученную смесь фильтруют через фильтровальную бумагу по 5.10.

Примечание — При соблюдении условий, описанных в 6.1, порция суспендированной пробы массой 45 г включает в себя 25 г анализируемой пробы сушеных фруктов и 20 $см^3$ воды. При этом за объем приготовленного экстракта (V_1 = 75 $см^3$) принимается сумма объемов содержащейся в анализируемой пробе воды и добавленных метанола и раствора фосфорной кислоты.

6.3 Очистка экстракта на колонке с иммуноаффинным сорбентом

Колоночную очистку экстракта можно проводить как с применением разрежения, так и путем создания давления на входе в колонку, а также путем пропускания определенных объемов экстракта и элюента через колонку под действием силы тяжести. Необходимо следить, чтобы скорость протока при этом не превышала оговоренного для данной колонки предельно допустимого значения. В данном отношении особое внимание требуется проявлять при работе с вакуумным манифолдом.

Подготовку иммуноаффинной колонки к работе проводят в соответствии с инструкциями производителя. Порцию фильтрованного экстракта из пробы объемом 12 $см^3$ помещают в мерную или коническую колбу вместимостью 100 $см^3$, объем содержимого в колбе доводят до 100 $см^3$ фосфатно-хлоридным буферным раствором по 4.13, содержимое колбы тщательно перемешивают.

Аликвоту разбавленного экстракта объемом 50 $см^3$ (V_3 = 6 $см^3$) пропускают через иммуноаффинную колонку. При этом скорость протока не должна превышать 5 $см^3$/мин. При проведении процедуры очистки нельзя допускать попадания в колонку воздуха и высыхания сорбента. По окончании пропускания экстракта колонку промывают, пропуская через нее 10 $см^3$ воды (или фосфатно-хлоридного буферного раствора в зависимости от инструкции производителя). Для последующего сбора элюента используют флакон по 5.2.

Примечание — При проведении очистки экстракта следует обращать внимание на то, чтобы сорбционная емкость колонки не была превышена.

6.4 Приготовление раствора пробы для хроматографического анализа

Охратоксин А элюируют во флакон по 5.2 с использованием подходящего растворителя, который выбирают в соответствии с инструкциями производителя иммуноаффинной колонки. Полученный элюат выпаривают досуха в токе азота. Сухой остаток перерастворяют в 1,0 $см^3$ растворителя для инжекций по 4.18 (V_2 = 1 $см^3$). Полученный раствор используют для хроматографического анализа.

Допускается готовить раствор пробы для хроматографического анализа более разбавленным, при этом к раствору объемом 1 $см^3$, полученному после упаривания элюента и перерастворения сухого остатка, добавляют 2 $см^3$ воды (V_2 = 3 $см^3$), полученный раствор тщательно перемешивают.

Процедуры очистки экстракта и подготовки раствора пробы к хроматографическому анализу допускается проводить с использованием автоматизированной системы, например автоматизированной системы очистки методом твердофазной экстракции (ASPEC) при условии соблюдения всех параметров, оговоренных в настоящей методике, в частности, объемов разведения и скорости элюирования.

6.5 Приготовление раствора пробы с добавкой охратоксина А для контроля полноты обнаружения

Порцию суспендированной холостой пробы фруктов массой 45 г, измеренной с точностью до 0,2 г, помещают в стакан или в резервуар блендера. Добавляют 50 мм^3 стандартного раствора охратоксина А по 4.25. Приготовленную таким образом пробу с добавкой охратоксина А выдерживают в вытяжном шкафу не менее 30 мин. Дальнейшие операции проводят в соответствии с 6.2.

7 Анализ с помощью ВЭЖХ

7.1 Условия хроматографического анализа

Приведенные ниже параметры обеспечивают удовлетворительное качество хроматографического анализа при использовании колонки по 5.11.4 и подвижной фазы по 4.19. При этом время удерживания пика охратоксина А находится в интервале от 9 до 10 мин.

- скорость потока подвижной фазы через колонку: 1,0 см^3/мин;
- длина волны эмиссии флюориметрического детектора: 477 нм;
- длина волны возбуждения флюориметрического детектора: 333 нм;
- объем инжекции: от 100 до 200 мм^3;
- объем инжекции в случае разбавления раствора пробы для хроматографического анализа: от 300 до 600 мм^3.

7.2 Условия послеколоночной дериватизации (применяется по выбору пользователя)

Применение послеколоночной дериватизации позволяет повысить чувствительность и снизить предел обнаружения охратоксина А. Для некоторых видов проб данный прием позволяет уменьшить помехи, вносимые присутствием на хроматограмме пиков других веществ из матрицы пробы. Послеколоночная дериватизация может быть использована для подтверждения идентичности пика охратоксина А на хроматограмме раствора пробы. Приведенные ниже параметры обеспечивают увеличение чувствительности определения охратоксина А в 3—4 раза при условии использования системы послеколоночной дериватизации по 5.11.8 и колонки по 5.11.4:

- скорость потока раствора для послеколоночной дериватизации по 4.8: 0,3 см^3/мин;
- длина волны эмиссии флюориметрического детектора: 440 нм;
- длина волны возбуждения флюориметрического детектора: 390 нм;
- размеры капилляра, используемого в качестве послеколоночного реактора: длина 1500 мм, размер внутреннего диаметра 0,25 мм;
- объем инжекции: от 100 до 200 мм^3;
- объем инжекции в случае разбавления раствора пробы для хроматографического анализа: от 300 до 600 мм^3.

Примечание 1 — 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.

Примечание 2 — Следует принимать меры по предотвращению распространения паров аммиака в воздухе, например, поместив в резервуар для сбора элюата насыщенный раствор лимонной кислоты.

7.3 Приготовление градуировочных растворов

Готовят четыре градуировочных раствора с использованием мерных колб вместимостью 5 см^3 в соответствии с таблицей 1. Для доведения объема градуировочного раствора до метки используют раствор для инжекций по 4.18.

Таблица 1 — Приготовление градуировочных растворов

Градуировочный раствор	Объем растворителя для инжекций по 4.18, используемый для приготовления градуировочного раствора, мм^3	Объем стандартного раствора по 4.26, используемый для приготовления градуировочного раствора, мм^3	Массовая концентрация охратоксина А в градуировочном растворе, нг/см^3
1	4960	40	2,0
2	4900	100	5,0
3	4840	160	8,0
4	4800	200	10,0

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.

7.4 Градуировочный график

Градуировку осуществляют ежедневно перед проведением испытаний, для чего проводят хроматографический анализ градуировочных растворов, приготовленных в соответствии с таблицей 1. Градуировочный график устанавливают методом регрессионного анализа, откладывая по оси абсцисс значения массовой концентрации охратоксина А, нг/см^3, по оси ординат — соответствующие значения площади или высоты пика. Проверяют линейность градуировочной характеристики ($r^2 \geq 0{,}998$).

7.5 Определение охратоксина А в растворе пробы

Проводят хроматографический анализ растворов проб по 6.4 при тех же условиях, что были использованы при анализе градуировочных растворов.

7.6 Идентификация пиков

Пик охратоксина А на хроматограмме раствора пробы идентифицируют по совпадению его времени удерживания с временем удерживания 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 для хроматографического анализа разбавляют до получения в нем массовой концентрации охратоксина А в пределах диапазона градуировки. При этом во всех последующих расчетах необходимо учитывать коэффициент разбавления.

8 Обработка результатов

Массовую концентрацию охратоксина А в растворе пробы по 6.4, нг/см^3, определяют по градуировочному графику по 7.4.

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

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

где ρ_{ota} — массовая концентрация охратоксина А в анализируемом растворе пробы, соответствующая площади пика охратоксина А, нг/см^3;

V_1 — суммарный объем растворителей, использованных для экстракции, см^3 (V_1 = 75 см^3);

V_2 — объем раствора пробы для хроматографического анализа, полученного после элюирования с иммуноаффинной колонки по 6.4, см^3 (V_2 = 1 или 3 см^3);

V_3 — объем аликвоты экстракта, отобранной для очистки на иммуноаффинной колонке, см^3 (V_3 = 6 см^3);

m_s — масса анализируемой пробы, г (m = 25 г).

9 Презиционность

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 неприменимы 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 равны:
- коринка: $\bar{x}$ = 4,51 мкг/кг, r = 0,73 мкг/кг;
- кишмиш: $\bar{x}$ = 11,39 мкг/кг, r = 1,79 мкг/кг;
- смесь сушеных фруктов: $\bar{x}$ = 1,14 мкг/кг, r = 0,27 мкг/кг;
- изюм: $\bar{x}$ = 7,55 мкг/кг, r = 1,04 мкг/кг;
- инжир сушеный: $\bar{x}$ = 2,55 мкг/кг, r = 0,62 мкг/кг.

9.3 Воспроизводимость

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

Значения предела воспроизводимости равны:
- коринка: $\bar{x}$ = 4,51 мкг/кг, R = 3,59 мкг/кг;
- кишмиш: $\bar{x}$ = 11,39 мкг/кг, R = 4,55 мкг/кг;
- смесь сушеных фруктов: $\bar{x}$ = 1,14 мкг/кг, R = 0,45 мкг/кг;
- изюм: $\bar{x}$ = 7,55 мкг/кг, R = 2,95 мкг/кг;
- инжир сушеный: $\bar{x}$ = 2,55 мкг/кг, R = 1,28 мкг/кг.

10 Протокол результатов испытаний

Протокол результатов испытаний должен содержать, как минимум, следующие сведения:
a) всю информацию, необходимую для идентификации пробы;
b) ссылку на настоящий стандарт или использованный метод;
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)

Типичная хроматограмма

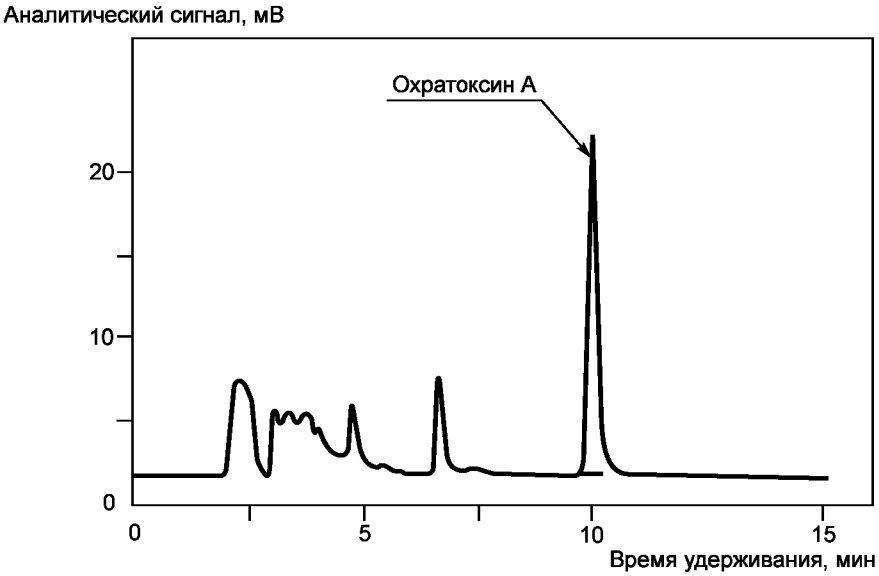

Рисунок А.1 —Типичная хроматограмма изюма с содержанием охратоксина А около 9 мкг/кг

Приложение В
(справочное)

Данные по прецизионности методики

Приведенные ниже данные получены в результате межлабораторных испытаний [3] в соответствии с Руководством АОАС по проведению межлабораторных испытаний для валидации методов анализа [4].

Таблица В.1 — Данные по прецизионности методики

Показатель	Коринка	Кишмиш	Смесь сушеных фруктов	Изюм	Инжир сушеный
Год проведения испытаний	2002	2002	2002	2002	2002
Количество лабораторий-участников	20	24	24	24	24
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	20	22	20	21	22
Количество выбросов (лабораторий)	0	2	4	3	2
Число принятых результатов	20	22	20	21	22
Среднее значение $\bar{x}$, мкг/кг	4,51	11,39	1,14	7,55	2,55
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/кг	0,26	0,64	0,10	0,37	0,22
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	5,7	5,6	8,6	4,9	8,7
Предел повторяемости r [$r = 2{,}8 s_r$], мкг/кг	0,73	1,79	0,27	1,04	0,62
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/кг	1,28	1,63	0,16	1,05	0,46
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_r, %	28,4	14,3	14,2	14,0	18,0
Предел воспроизводимости r [$R = 2{,}8 \times s_R$], мкг/кг	3,59	4,55	0,45	2,95	1,28
Полнота обнаружения, %[a]		72	72	73	74
Значение индекса Горвица, рассчитанное по прогнозируемому стандартному отклонению с использованием уравнения Томпсона ($PRSD_R$) [5] и [6]	1,3	0,7	0,6	0,6	0,8

[a] Значения полноты обнаружения найдены для каждой матрицы по результатам анализов единичного образца с искусственным внесением охратоксина А на уровне 5 мкг/кг, выполненных каждой лабораторией-участником межлабраторных испытаний.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочного европейского регионального стандарта ссылочному национальному стандарту Российской Федерации

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного европейского регионального стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ЕН ИСО 3696	MOD	ГОСТ Р 52501—2005 (ИСО 3696:1987) «Вода для лабораторного анализа. Технические условия»
Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов: - MOD — модифицированный стандарт.		

Библиография

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

[2] Wood, G. M., Patel, S., Entwisle, A. C. and Boenke, A., 1996, Ochratoxin A in wheat: a second intercomparison of procedures, *Food Additives and Contaminants*, 13, pp. 519—539

[3] MacDonalds, S. J., Anderson, S., Brereton, P., and Wood, R. (2003). Determination of Ochratoxin A in currants, raisins, sultanas, mixed dried fruit, and frigs by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: interlaboratory Study, *Journal of AOAC International*., 86, pp. 1164—1171

[4] AOAC International 1995, AOAC official Methods Program, Associate Referee's Manual on Development, Study, Review, and Approval Process. Part IV AOAC Guidelines for Collaborative Studies, pp. 23—51

[5] 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, pp. 1095—1109

[6] 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, pp. 385—386

УДК 663/664:543:544.53:006.354 ОКС 67.050 67.080.10 Н09 ОКСТУ 9109 9709

Ключевые слова: продукты пищевые, определение охратоксина А, коринка, кишмиш, смеси сушеных фруктов, инжир сушеный, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, обработка результатов, прецизионность

Редактор *М.Е. Никулина*
Технический редактор *Е.В. Беспрозванная*
Корректор *В.И. Варенцова*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 04.02.2015. Подписано в печать 13.02.2015. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,50. Тираж 128 экз. Зак. 911.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru