ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(EACC)
EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(EASC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33682— 2015

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение Т-2 токсина хроматографическим методом

Издание официальное

Зарегистрирован
№ 11900
14 декабря 2015 г.

Минск
Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0–2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2–2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и сертификации» и Межгосударственным техническим комитетом МТК 534 «Обеспечение безопасности сельскохозяйственной продукции и продовольственного сырья на основе принципов НАССР»

2 ВНЕСЕН Комитетом технического регулирования и метрологии Министерства по инвестициям и развитию Республики Казахстан

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протоколом от 10 декабря 2015 г. № 48-2015)

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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Настоящий стандарт разработан на базе национального стандарта Республики Казахстан СТ РК 1974-2010 «Пищевые продукты. Определение Т-2 токсина хроматографическим методом».

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация также будет опубликована в сети Интернет на сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты».

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств.

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

Пищевые продукты
Определение Т-2 токсина хроматографическим методом

Food products
Determination of T-2 toxin by chromatographic method

Дата введения –

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы по обнаружению, идентификации и определению Т-2 токсина в пищевых продуктах и продовольственном сырье.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные нормативные документы:

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

ГОСТ 12.1.005–88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны;

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

ГОСТ 12.1.019–79 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты;

ГОСТ 12.4.009–83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание;

ГОСТ 12.4.021–75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования;

ГОСТ 83–79 Реактивы. Натрий углекислый. Технические условия;

ГОСТ 1770–74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия;

ГОСТ 2603–79 Реактивы. Ацетон. Технические условия;

ГОСТ 4166–76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия;

ГОСТ 4204–77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия;

ГОСТ 4234–77 Реактивы. Калий хлористый. Технические условия;

ГОСТ 5955–75 Реактивы. Бензол. Технические условия;

ГОСТ 6995–77 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия;

ГОСТ 9805–84 Спирт изопропиловый. Технические условия;

Издание официальное

ГОСТ 12430–66 Продукция сельскохозяйственная. Методы отбора проб при карантинном досмотре и экспертизе;

ГОСТ 24104–2001 Весы лабораторные. Общие технические требования.

ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов на территории государства по соответствующему указателю стандартов, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом, следует руководствоваться замененным (измененным) стандартом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Сущность метода заключается в извлечении токсина, очистке экстракта методом жидкость-жидкостной экстракции с последующей доочисткой на хроматографической колонке и/или с помощью препаративной ТСХ и количественном определении методом газо-жидкостной хроматографии в виде трифторацетильных (ТФА) производных.

4 Аппаратура, материалы и реактивы

Аппарат для встряхивания проб типа АВУ-6С.

Ротационный испаритель с ловушкой.

Кофемолка ЭКМ-3У.

Лабораторная мельница ЛМ3.

Сушильный шкаф, который может поддерживать температуру 105 ºС.

Весы лабораторные аналитические общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200 г, второго класса точности по ГОСТ 24104

Хроматограф газовый с детектором электронного захвата.

Колонка стеклянная 1 м х 0,4 см с с жидкой фазой OV-1 или OV-101 на Хроматоне.

Потенциометр диапазоном измерений 1 мВ в качестве самописца – регистрирующего.

Газ-носитель и продувочный азот особой чистоты.

Прибор для флуоресционного анализа витаминов в растворе (модель 833) или диагностическая лампа ОЛ.

Магнитная мешалка любого типа.

Микрошприц МШ-10 на 10 мкл, микрошприц МШ на 1 мкл.

Камеры для ТСХ с притертыми крышками (например, стеклянные четырехугольные сосуды 195 х 95 х 200).

Пластины для ТСХ размером 20х20 см.

Воронки делительные по ГОСТ 25336.

Химические воронки по ГОСТ 25336.

Колбы плоскодонные или конические на 250 мл с НШ2 и КиКШ 250-29/32 по ГОСТ 25336.

Колбы круглодонные вместимостью 250 мл с НШ 29, тип ККШ-250-29/32 по ГОСТ 25336.

Колбы грушевидные вместимостью 50 мл с НШ 14,5 тип ГрКШ-5014/23 по ГОСТ 25336.

Колбы мерные вместимостью 100 мл, тип 2-100-2 по ГОСТ 1770.

Цилиндры мерные на 100 мл с притертой пробкой, тип 2-100 по ГОСТ 1770.

Распылитель стеклянный с грушей.

Т-2 токсин кристаллический номер по каталогу Т 4887, фирма «Сигма», США.

Ацетонитрил ч..

Ацетон ч.д.а. по ГОСТ 2603.

Бензол ч.д.а. по ГОСТ 5955.

Гексан ч.

Метанол ч.д.а. по ГОСТ 6995.

Изопропиловый спирт (пропанол-2) хч по ГОСТ 9805.

Кислота серная ч.д.а. по ГОСТ 4204.

Калия хлорид ч.д.а. по ГОСТ 4234.

Натрия сульфат ч.д.а. по ГОСТ 4166.

Натрия карбонат ч.д.а по ГОСТ 83, свежепрокаленный.

Трифторуксусный ангидрид ч.

Примечание – Допускается использовать аппаратуру и другие средства измерений, имеющие аналогичные метрологические характеристики, разрешенные в соответствии с действующим законодательством.

5 Отбор проб

Отбор проб для анализа следует проводить в соответствии с требованиями ГОСТ 12430.

5.1 Экстракция из отобранной пробы

Отобранную пробу для анализа измельчают от 1 до 2 минут в кофемолке или лабораторной мельнице. Навеску 20 г измельченного продукта помещают в плоскодонную или коническую колбу вместимостью 250 мл, добавляют 10 мл раствора хлорида калия с массовой долей 4 % и 90 мл ацетонитрила. Встряхивают на аппарате для встряхивания типа АВУ-6С в течение 30 минут. Полученную смесь фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерный цилиндр, отбирают 70 мл фильтрата (аликвота соответствует 14 г исходного образца).

5.2 Очистка экстракта

5.2.1 Жидкость – жидкостная экстракция

В делительную воронку, вместимостью 250 или 500 мл переносят 70 мл фильтрата, добавляют 50 мл гексана (или гептана).

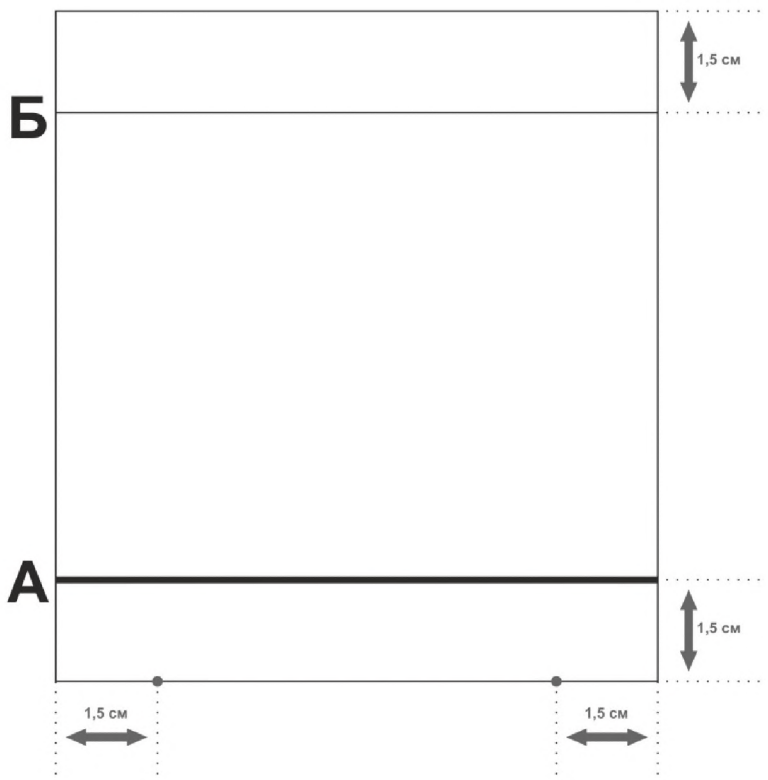
После встряхивания и разделения слоев верхний гексановый слой

отбрасывают. Нижний ацетонитрильный слой еще дважды встряхивают с 40 мл гексана, каждый раз отбрасывая верхний гексановый слой. Ацетонитрильный слой разбавляют 17 мл дистиллированной водой и экстрагируют 50 и 25 мл бензола. Верхние бензольные слои отделяют и сушат безводным сульфатом натрия (от 10 до 15 г) в течение 0,5 часа. Раствор фильтруют через химическую воронку с кусочком ваты в круглодонную колбу вместимостью 250 мл.

Сульфат натрия промывают 10 мл бензола и отфильтровывают бензол в ту же круглодонную колбу. Упаривают бензольный раствор на ротационном испарителе при температуре водяной бани от 45 °С до 50 °С досуха. Остаток растворяют в бензоле объемом от 200 до 300 мкл и очищают с помощью препаративной ТСХ (раствор А).

5.2.2 Очистка с помощью препаративной ТСХ

На пластинку ТСХ (20х20 см) наносят по 5 мкл стандартного раствора Т-2 токсина в бензоле (по 500 нг Т-2 токсина) в правый и левый нижние ее углы на расстоянии 1,5 см от краев как показано на рисунке 1. Параллельно нижнему краю пластинки на расстоянии 1,5 см от нижнего края равномерно наносят с помощью шприца 10 мкл раствора А в виде прямой линии шириной не более 3 мм.



● – точки нанесения стандартного раствора Т-2 токсина в бензоле;
А – линия нанесения раствора А;
Б – карандашная линия.

Рисунок 1 – Разметка пластины ТСХ.

После нанесения всего раствора А в круглодонную колбу добавляют еще 100–150 мкл бензола и наносят бензольную промывку на ту же прямую линию. Пластинку помещают в камеру для ТСХ со смесью гексана и изопропилового спирта (7:2). Выдерживают пластинку до достижения фронтом растворителя карандашной

линии, проведенной в 1,5 см от верхнего края пластинки. Пластинку извлекают из камеры и высушивают. Разрезают пластинку по линиям А и Б. Узкие полоски пластинки с нанесенным раствором Т-2 токсина опрыскивают 20 %-ным раствором серной кислоты в метаноле. Пластинки выдерживают в сушильном шкафу при 105 °С в течение от 1 до 3 минут и рассматривают в длинноволновом УФ-свете. Пятна Т-2 токсина (бело-голубая флуоресценция, R (0,6–0,7) обводят тонкой карандашной линией. Затем узкие полоски прикладывают к пластинке с нанесенным экстрактом и отмечают на этой пластинке зону, соответствующую хроматографической подвижности стандарта Т-2 токсина. Ширина зоны должна быть примерно на 7 мм (с каждой стороны) больше протяженности пятна стандарта Т-2 токсина в направлении развития хроматограммы; зону отмечают в виде двух карандашных линий, параллельных нижнему краю пластинки. Силикагель из отмеченной зоны соскабливают с помощью скальпеля или шпателя в пробирку вместимостью 5 мл, приливают 4 мл смеси бензол-ацетон (1:1) и встряхивают. Суспензию силикагеля фильтруют через химическую воронку с кусочком ваты в грушевидную колбу на 50 мл. Силикагель повторно (2 х 4 мл) промывают смесью бензол-ацетон (1:1). Объединенные бензолацетоновые экстракты упаривают досуха на ротационном испарителе. Остаток переносят с помощью 200 мкл бензола в пробирку вместимостью 5 мл (раствор В).

6 Обнаружение, идентификация и определение содержания Т-2 токсина

6.1 Приготовление стандартного раствора Т-2 токсина

Навеску 10 мг кристаллического Т-2 токсина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки бензолом. Концентрация Т-2 токсина в стандартном растворе составляет 100 нг/мкл или 100 мкг/мл. Раствор хранят в холодильнике при температуре не выше 5 °С. Срок годности стандартного раствора – до 2 лет.

6.2 Получение ТФА производных

а) Получение ТФА производного стандарта Т-2 токсина

В мерную пробирку на 5 мл добавляют 50 мкл стандартного раствора Т-2 токсина в бензоле, добавляют 250 мкл бензола, от 30 до 50 мг свежепрокаленного карбоната натрия и 50 мкл трифторуксусного ангидрида. Пробирку плотно закрывают стеклянной притертой пробкой и перемешивают при температуре от 20 °С до 25 °С в течение 0,5 часа на магнитной мешалке (в пробирку предварительно помещают «гвоздик» для перемешивания – кусочек металлической канцелярской скрепки длиной от 3 до 4 мм, запаянный в стеклянный капилляр). Содержимое пробирки разбавляют бензолом до 1 мл и фильтруют через химическую воронку с кусочком ваты в другую пробирку на 5 мл, карбонат натрия на фильтре промывают 0,5 мл бензола. Объединенные бензольные фильтраты упаривают досуха в слабой струе азота (при отсутствии баллона с азотом можно упарить досуха на ротационном испарителе). Остаток растворяют в 200 мкл бензола и анализируют с помощью ГЖХ.

б) Получение ТФА-производных экстракта

К 300 мкл бензольного раствора очищенного экстракта (раствор В) добавляют карбонат натрий и трифторуксусный ангидрид и проводят получение ТФА производных аналогично 6.2.а.

6.3 Анализ ТФА производных методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ)

Условия ГЖХ анализа: температура колонки – 200 °С, температура испарителя – 235 °С, температура термостата детектора – 270 °С, скорость газа-носителя – от 90 до 100 мл/мин, скорость продувочного газа – от 190 до 200 мл/мин, шкала чувствительности – 2х10 – 12 А (на блок ИМТ).

В газовый хроматограф с помощью микрошприца на 1 мкл последовательно вносят 0,2 и 0,5 мкл (соответствуют 5 и 12,5 нг Т-2 токсина) раствора ТФА-производного стандарта Т-2 токсина в 200 мкл бензола (6.2.а). В каждом случае регистрируют время удерживания (в данных условиях порядка от 5 до 6 минут) и определяют площадь пика ТФА-производного Т-2 токсина ($S_{СТ}$). Площадь пика определяют умножением высоты пика на ширину пика на половине его высоты. Затем в газовый хроматограф вносят (в случае набивных колонок) от 0,5 до 1,0 мкл раствор ТФА производного экстракта (6.2.б). При наличии пика, соответствующего по времени удерживания ТФА-производному Т-2 токсина, определяют площадь ($S_{обр}$).

Содержание Т-2 токсина в исходной пробе определяют по формуле

$$\mathrm{C} = \frac{V_1 \cdot V_3 \cdot S_{\text{пр}} \cdot m_{\text{ст}}}{V_2 \cdot V_4 \cdot S_{\text{ст}} \cdot m_{\text{пр}}} \left(\frac{\text{мкг}}{\text{кг}}\right), \qquad (1)$$

где $S_{\text{пр.}}$ – площадь пика ТФА-производного Т-2 токсина в экстракте, мм^2;

$S_{\text{ст}}$ – площадь пика ТФА-производного стандарта Т-2 токсина, мм^2;

$m_{\text{ст}}$ – масса стандарта Т-2 токсина, внесенная в хроматограф, нг (5 или 12,5 нг);

$m_{пр}$ – масса исходной пробы, г (20 г);

V_1 – объем экстрагирующего растворителя, мл (100 мл);

V_2 – объем фильтрата, взятый для анализа, мл (70 мл);

V_3 – объем бензольного раствора ТФА-производного экстракта, мк (200 мкл);

V_4 – объем бензольного раствора ТФА-производного экстракта, внесенный в хроматограф, мкл.

8. Требования безопасности

8.1 При выполнении работ необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007. При работе с химическими веществами и реактивами необходимо работать в резиновых перчатках

8.2 Помещение, в котором проводятся работы, должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005.

8.3 При работе с электроустановками электробезопасность должна соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.019. Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009. При работе с УФ-излучением необходимо пользоваться защитным экраном и защитными очками.

УДК 579.672:637.065:006.354 МКС 67.050

Ключевые слова: пищевые сырье и продукты, отбор проб, подготовка проб, проведение анализа, обнаружение, идентификация и определение содержания Т-2 токсина

gost.e-ecolog.ru