МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 34049— 2017

МОЛОКО И КИСЛОМОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Определение содержания афлатоксина M_1 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим (спектрофлуориметрическим) детектированием

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2020

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН ТОО «КазВод-Консалтинг»

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

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 30 января 2017 г. № 95-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
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 24 декабря 2019 г. № 1441-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34049—2017 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2020 г.

5 Настоящий стандарт соответствует требованиям международного стандарта ISO 5725-6:1994 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

Настоящий стандарт подготовлен путем переоформления национального стандарта Республики Казахстан СТ РК 2388—2013 «Молоко и кисломолочные продукты. Определение содержания афлатоксина M_1 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим (спектрофлуориметрическим) детектированием»

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных 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»

© Стандартинформ, оформление, 2020

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 Термины и определения ... 2
4 Приписанные характеристики погрешности измерений ... 2
5 Средства измерений и вспомогательные устройства, материалы и реактивы ... 3
6 Метод измерения ... 4
7 Требования безопасности ... 5
8 Требования к квалификации оператора ... 5
9 Условия выполнения измерений ... 5
10 Подготовка к выполнению измерений ... 5
11 Приготовление растворов ... 5
12 Выполнение измерений ... 9
13 Обработка результатов измерений ... 12
14 Оформление результатов измерений ... 13
15 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории ... 13
16 Проверка приемлемости результатов, получаемых в условиях воспроизводимости ... 16
Приложение А (обязательное) Требования безопасности при работе с афлатоксинами ... 17
Приложение Б (справочное) Определение афлатоксина M_1 в молоке без обработки трифторуксусной кислотой ... 18
Приложение В (справочное) Контроль чистоты растворителей ... 19

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МОЛОКО И КИСЛОМОЛОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ

Определение содержания афлатоксина M_1 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим (спектрофлуориметрическим) детектированием

Milk and milk products. Determination of aflatoxin M_1 by high-performance liquid chromatography with fluorimetric (spectrofluorometric) detection

Дата введения — 2020—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методику выполнения измерений массовой доли афлатоксина M_1 в молоке и кисломолочных продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее — ВЭЖХ) с использованием жидкостного хроматографа с флуориметрическим (спектрофлуориметрическим) детектированием.

Допустимый уровень содержания афлатоксина M_1 в молоке и кисломолочных продуктах составляет не более 0,0005 мг/кг в сырье, предназначенном для производства детского питания, и в готовых продуктах детского и диетического питания — менее 0,00002 мг/кг.

Диапазон измеряемых значений массовой доли афлатоксина M_1 (масса навески пробы от 5 до 25 г в зависимости от вида продукции) составляет от 0,00002 до 0,0005 мг/кг.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 8.010 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики выполнения измерений. Основные положения

ГОСТ 8.513* Государственная система обеспечения единства измерений. Поверка средств измерений. Организация и порядок проведения

ГОСТ 12.0.004 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

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

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

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

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

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

ГОСТ 908 Кислота лимонная моногидрат пищевая. Технические условия

* Утратил силу на территории Российской Федерации с 01.12.2001 г.

Издание официальное

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

ГОСТ 2603 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3622 Молоко и молочные продукты. Отбор проб и подготовка их к испытанию

ГОСТ 4201 Реактивы. Натрий углекислый кислый. Технические условия

ГОСТ 4328 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 5644 Сульфит натрия безводный

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

ГОСТ 9656 Реактивы. Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 20015 Хлороформ. Технические условия

ГОСТ 22967 Шприцы медицинские инъекционные многократного применения. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 24104** Весы лабораторные. Общие технические требования

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

ГОСТ 26809.1 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовки проб к анализу. Часть 1. Молоко, молочные составные и молокосодержащие продукты

ГОСТ 27752 Часы электронно-механические кварцевые настольные, настенные и часы-будильники. Общие технические условия

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

ГОСТ 2922 (ИСО 386—77) Посуда лабораторная стеклянная. Термометры жидкостные стеклянные лабораторные. Принципы устройства, конструирования и применения

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

ПМГ 06—2001 Правила по межгосударственной стандартизации. Порядок признания результатов испытаний и утверждения типа, поверки, метрологической аттестации средств измерений

РМГ 29—2013 Рекомендации по межгосударственной стандартизации. Государственная система обеспечения единства измерений. Метрология. Основные термины и определения

РМГ 61—2010 Рекомендации по межгосударственной стандартизации. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru казателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 8.010, ГОСТ ИСО 5725-6, РМГ 29, ПМГ 06.

4 Приписанные характеристики погрешности измерений

4.1 Стандарт обеспечивает получение результатов измерений с погрешностью, не превышающей значений, приведенных в таблице 1.

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

** На территории Российской Федерации действует ГОСТ OIML R 76-1—2011 «Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания».

Таблица 1

Диапазон измерений*, мг/кг	Относительное среднее квадратическое отклонение (СКО)		Показатель точности** (доверительные границы относительной погрешности для P = 0,95) ±δ, %
	Показатель повторяемости σ_r, %	Показатель воспроизводимости σ_R, %	
От 0,00002 до 0,0005 включ.	8	16	32

* 1 мг/кг соответствует 1 млн$^{-1}$.

** Соответствует расширенной неопределенности результатов анализа при коэффициенте охвата k = 2 при P = 0,95.

4.2 Значения показателей точности методики используют при:

- оформлении результатов измерений, выдаваемых лабораторией;
- оценке качества проведения измерений (испытаний) в лаборатории;
- оценке возможности использования результатов измерений при реализации методики в конкретной лаборатории.

5 Средства измерений и вспомогательные устройства, материалы и реактивы

5.1 Средства измерений и вспомогательные устройства

5.1.1 Жидкостный хроматограф с флуориметрическим (спектрофлуориметрическим) детектором, обеспечивающим возбуждение флуоресценции в диапазоне длин волн (360 ± 20) нм и регистрацию интенсивности флуоресценции в диапазоне длин волн от (430 ± 20) нм. Применяемый детектор должен обеспечивать предел обнаружения афлатоксина M_1 в подвижной фазе не менее 1 нг/см^3.

5.1.2 Весы лабораторные общего назначения высокого или среднего класса точности с наибольшим пределом взвешивания 220 г и ценой деления 0,01 г по ГОСТ 24104.

5.1.3 Колбы мерные 2-25-2, 2-50-2, 2-100-2 по ГОСТ 1770.

5.1.4 Пипетки, градуированные 2-го класса точности вместимостью 1; 2; 5; 10 см^3 по ГОСТ 29227.

5.1.5 Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25; 50; 100; 1000 см^3 по ГОСТ 1770.

5.1.6 Государственный стандартный образец (далее — ГСО) состава раствора афлатоксина M_1 в ацетонитриле или смеси бензол-ацетонитрил 98:2 (массовая концентрация 1 мкг/см^3 погрешность ±10 %), например ГСО 7935—2001.

Применяемые средства измерений должны быть внесены в реестр государственной системы обеспечения единства измерений государств, принявших настоящий стандарт, по результатам испытаний с целью утверждения типа в установленном в государствах порядке или метрологической аттестации в соответствии с ПМГ 06 и поверены в соответствии с ГОСТ 8.513.

Допускается использование других средств измерений и стандартных образцов с аналогичными или более высокими метрологическими характеристиками.

Для внесения добавок и приготовления растворов в небольших объемах рекомендуется использовать одноканальные пипеточные дозаторы вместимостью от 200 до 1000 мм^3 с погрешностью дозирования не более ±2 %.

5.2 Средства вывода информации

5.2.1 Сбор, обработка данных и вывод результатов анализа осуществляются с помощью персонального компьютера, на котором установлена программа сбора и обработки хроматографических данных.

5.3 Вспомогательное оборудование и материалы

5.3.1 Хроматографическая колонка, заполненная обращенно-фазовым сорбентом С18, с предколонкой, заполненной тем же сорбентом, обеспечивающая число теоретических тарелок для пика афлатоксина M_1 не менее 2000, например хроматографическая колонка длиной 150 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная обращенно-фазовым сорбентом Кромасил С18 с зернением 5 мкм. Допускается использование колонок иных типоразмеров, заполненных аналогичными сорбентами, при условии, что они обеспечивают указанное выше число теоретических тарелок.

5.3.2 Устройство для измельчения пробы (микроизмельчитель тканей любого типа, лабораторная мельница или кофемолка).

5.3.3 Перемешивающее устройство с подогревом или водяная баня любого типа с регулятором температуры по действующим в государствах, принявших настоящий стандарт, нормативным документам.

5.3.4 Дозаторы пипеточные любой марки переменного тока вместимостью от 100 до 1000 мм^3 с метрологическими характеристиками по ГОСТ 28311.

5.3.5 Колбы мерные 2-го класса точности вместимостью 25; 50; 100; 500 см^3 по ГОСТ 1770.

5.3.6 Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 10; 50; 500 см^3 по ГОСТ 1770.

5.3.7 Пробирка для микропроб однократного применения, вместимость 1,5 см^3.

5.3.8 Насос лабораторный вакуумный, мембранный или водоструйный по ГОСТ 25336, обеспечивающий разрежение от 20 мм рт. ст. до 75 мм рт. ст.

5.3.9 Центрифуга лабораторная любого типа, частота вращения не менее 5000 об/мин.

5.3.10 Пробирки для центрифугирования пластиковые вместимостью 30 см^3.

5.3.11 Воронки делительные вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 25336.

5.3.12 Воронки химические диаметром 60 мм по ГОСТ 25336.

5.3.13 Колбы плоскодонные вместимостью 250 см^3 по ГОСТ 25336.

5.3.14 Колбы остродонные для упаривания вместимостью 30 см^3 по ГОСТ 25336.

5.3.15 Баня водяная с диапазоном от 30 °С до 90 °С, предел допускаемой погрешности не более ±1 °С, погрешность стабилизации температуры в рабочей камере не более ±1 °С.

5.3.16 Фильтры бумажные «красная лента», средняя скорость фильтрации 450 с (время по Херцбергу), пределы задержания от 2 мкм до 4 мкм, содержание золы 0,004 % по действующим в государствах, принявших настоящий стандарт, нормативным документам.

5.3.17 Концентрирующие патроны для подготовки проб методом твердофазной экстракции (далее — ТФЭ), с содержанием силикагеля 1 см^3 или 3 см^3 по нормативным документам, действующим в государствах, принявших настоящий стандарт.

5.3.18 Шприцы медицинские вместимостью 20 см^3 по ГОСТ 22967.

5.3.19 Часы по ГОСТ 27752.

5.3.20 Термометр по ГОСТ 29224.

5.4 Реактивы

5.4.1 Реактивы для приготовления деконтаминационного раствора — раствора для разрушения афлатоксина M_1 после анализа (требования безопасности) — приведены в приложении А.

5.4.2 Хлорамин, х. ч., массовая доля активного хлора 25 %.

5.4.3 Гидроокись натрия, х. ч., по ГОСТ 4328.

5.4.4 Борная кислота, х. ч., по ГОСТ 9656.

5.4.5 Натрий углекислый кислый, ч. д. а., по ГОСТ 4201.

5.4.6 Натрий хлористый по ГОСТ 4328.

5.4.7 Хлороформ по ГОСТ 20015.

5.4.8 Лимонная кислота по ГОСТ 908;

5.4.9 Трифторуксусная кислота по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших настоящий стандарт.

5.4.10 Ацетон по ГОСТ 2603.

5.4.11 Ацетонитрил чистый для анализа по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших настоящий стандарт.

5.4.12 Изопропонол чистый по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших настоящий стандарт.

5.4.13 Натрий безводный по ГОСТ 5644.

Допускается использование реактивов аналогичной или более высокой квалификации, изготовленных по другим нормативным документам.

6 Метод измерения

6.1 Метод определения массовой доли афлатоксина M_1 в молоке и кисломолочных продуктах основан на последовательном проведении следующих операций:

- экстракция афлатоксина M_1 из образца;
- очистка экстракта методом ТФЭ с использованием концентрирующего патрона для подготовки проб методом ТФЭ;
- перевода афлатоксина M_1 в интенсивно флуоресцирующее соединение обработкой трифторуксусной кислотой и определение массовой доли афлатоксина M_1 в форме его производного методом обращенно-фазовой хроматографии с флуориметрическим детектированием.

7 Требования безопасности

7.1 При выполнении измерений массовой доли афлатоксина M_1 необходимо соблюдать требования техники безопасности:

- техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007;
- электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019;

7.2 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

7.3 Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать допустимых значений по ГОСТ 12.1.005.

7.4 Организацию обучения работающих безопасным методам труда проводят по ГОСТ 12.0.004.

7.5 При работе с афлатоксином M_1 следует соблюдать особую осторожность из-за его высокой токсичности. Основные условия и правила работы приведены в приложении А.

8 Требования к квалификации оператора

8.1 К выполнению измерений и обработке их результатов допускают специалиста, имеющего высшее или среднее специальное образование и опыт работы в химической лаборатории, прошедшего соответствующий инструктаж, освоившего метод анализа в процессе обучения и получившего удовлетворительные результаты при оперативном контроле процедуры измерений.

9 Условия выполнения измерений

9.1 При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха — (20 ± 5) °С;
- атмосферное давление — от 84,0 до 106,7 кПа (от 630 до 800 мм рт. ст.);
- влажность воздуха — не более 80 % при температуре 25 °С;
- напряжение в сети — (220 ± 22) В;
- частота переменного тока — 50 гц.

10 Подготовка к выполнению измерений

10.1 Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: отбор проб по ГОСТ 3622 и ГОСТ 26809.1, подготовка стеклянной посуды, приготовление растворов, проверка и градуировка хроматографа, контроль чистоты растворителей, подготовка пробы к анализу.

10.2 Отбор проб

10.2.1 Отбор проб проводится в соответствии с нормативными документами на данный вид продукции по ГОСТ 3622 и ГОСТ 26809.1.

Анализ необходимо провести в течение 3 суток с момента отбора при условии хранения проб при температуре, предусмотренной для хранения данного вида продукции.

Отобранную пробу при необходимости измельчают. Количество пробы, отбираемой для анализа, составляет не менее 100 г.

10.3 Подготовка стеклянной посуды

10.3.1 Посуду для приготовления и хранения подвижной фазы моют только серной кислотой (без применения других моющих средств) и ополаскивают дистиллированной водой и ацетонитрилом по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших настоящий стандарт.

10.3.2 Остальную стеклянную посуду моют горячей водой с моющим средством, тщательно ополаскивают дистиллированной водой и сушат при температуре 105 °С. Посуда, находившаяся в контакте с афлатоксином M_1, подлежит обработке в соответствии с приложением А.

11 Приготовление растворов

11.1 При приготовлении и хранении растворов недопустимо использование резиновых и корковых пробок. Приготовленные растворы должны храниться в условиях, исключающих испарение компонентов смеси.

11.2 Смешанный раствор хлористого натрия (массовая доля 20 %) и лимонной кислоты (массовая доля 2,4 %).

11.2.1 В плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3 помещают 40 г хлористого натрия, 4,8 г лимонной кислоты и растворяют в 155 см^3 дистиллированной воды. Срок хранения — 3 мес.

11.3 Смесь ацетонитрил-изопропанол-вода в объемном соотношении 6:9:85 (подвижная фаза, далее — ПФ).

11.3.1 В мерный цилиндр вместимостью 500 см^3 помещают 30 см^3 ацетонитрила и 45 см^3 изопропанола. Доводят объем смеси до 500 см^3 дистиллированной водой. Раствор переливают в заранее подготовленную стеклянную плотно закрывающуюся емкость для постоянного хранения и тщательно в ней перемешивают. Срок хранения — 2 мес.

11.4 Смесь хлороформ-ацетон, объемное соотношение 4:1.

11.4.1 В плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3 помещают 40 см^3 ацетона, 160 см^3 хлороформа и 5 г безводного натрия сернокислого. Закрывают стеклянной пришлифованной пробкой и тщательно перемешивают. Срок хранения — 3 мес.

11.5 Растворы афлатоксина M_1

11.5.1 Растворы афлатоксина M_1 должны храниться в темноте при температуре не выше 6 °С в герметичной посуде, исключающей возможность испарения растворителя и контакт раствора с иными материалами, чем стекло и фторопласт. Растворы каждой концентрации готовят по потребности.

11.5.1.1 Приготовление раствора афлатоксина M_1 номинального значения массовой концентрации 0,02 мкг/см^3.

11.5.1.1.1 В мерную колбу вместимостью 25 см^3 помещают 0,5 см^3 стандартного образца состава раствора афлатоксина M_1 массовой концентрации 1 мкг/см^3 и доводят до метки ацетонитрилом.

11.5.1.1.2 Если действительное значение массовой концентрации афлатоксина M_1 (приведено в паспорте на стандартный образец) отличается от номинального значения (1 мкг/см), то массовую концентрацию афлатоксина M_1 в приготовленном растворе C_1, мкг/см^3, вычисляют по формуле

$$C_1 = \frac{C_0 \cdot V_0}{V_1}, \quad (1)$$

где C_0 — действительное значение массовой концентрации афлатоксина M_1 в стандартном образце, мкг/см^3;

V_0 — объем стандартного образца, взятый для приготовления раствора, см^3;

V_1 — объем приготовленного раствора, см^3.

Срок хранения — 6 мес в холодильнике.

11.5.1.2 Приготовление раствора афлатоксина M_1 номинального значения массовой концентрации 0,006 мкг/см^3.

11.5.1.2.1 В мерную колбу вместимостью 50 см^3 помещают 0,3 см^3 стандартного образца (далее — СО) состава раствора афлатоксина M_1 массовой концентрации 1 мкг/см^3 и доводят до метки ацетонитрилом.

Срок хранения — 6 мес в холодильнике.

11.5.1.3 Приготовление градуировочных растворов афлатоксина M_1 в подвижной фазе номинального значения массовой концентрации 50; 10; 2 нг/см^3.

11.5.1.3.1 В колбу для упаривания помещают указанный в таблице 2 объем раствора афлатоксина M_1 номинального значения массовой концентрации 0,02 мкг/см^3 по 11.5.1.1, удаляют растворитель упариванием при температуре от 40 °С до 45 °С до сухого остатка в вакууме.

Таблица 2 — Значения объемов раствора афлатоксина M_1

Массовая концентрация афлатоксина M_1 в градуировочном растворе (номинальное значение), нг/см^3	Объем раствора афлатоксина M_1 массовой концентрации 0,02 мкг/см^3, V_1, см^3	Объем подвижной фазы, добавляемый к сухому остатку, V_2, см^3
50	2,5	1
10	0,5	1
2	0,5	5

11.5.1.3.2 К сухому остатку добавляют 50 мм^3 трифторуксусной кислоты, тщательно перемешивают, выдерживают 5 мин в колбе, закрытой стеклянной пришлифованной пробкой. Затем остаток кислоты отгоняют в вакууме досуха, до исчезновения запаха трифторуксусной кислоты, сухой остаток растворяют в соответствующем объеме подвижной фазы по 11.3, перемешивают и выдерживают перед измерениями не менее 5 мин, закрыв колбу пробкой.

Растворы готовят в день проведения анализа.

11.5.1.3.3 Действительное значение массовой концентрации афлатоксина M_1 в приготовленных растворах C_i, нг/см^3, вычисляют по формуле

$$C_i = \frac{C_1 \cdot V_1}{V_2} \cdot 1000, \quad (2)$$

где C_1 — действительное значение массовой концентрации афлатоксина M_1 в растворе, приготовленном по 11.5.1.1.1, мкг/см^3;

V_1 — объем раствора по 11.5.1.3.1, взятый для приготовления раствора, см^3;

V_2 — объем подвижной фазы (таблица 2), см^3.

11.5.1.4 Приготовление проверочного раствора афлатоксина M_1 в подвижной фазе номинального значения массовой концентрации 6 нг/см^3.

11.5.1.4.1 В колбу для упаривания помещают 0,5 см^3 раствора афлатоксина M_1 номинального значения массовой концентрации 0,006 мкг/см^3 (11.5.1.2.1), удаляют растворитель упариванием в вакууме при температуре от 40 °С до 45 °С и проводят операции по 11.5.1.3.1, начиная со стадии добавления 50 мм^3 раствора трифторуксусной кислоты. Сухой остаток после отгонки кислоты растворяют в 0,5 см^3 подвижной фазы по 11.3, перемешивают и выдерживают перед измерениями не менее 5 мин в закрытом сосуде. Действительное значение массовой концентрации раствора вычисляют по формуле (2).

Раствор готовят в день проведения анализа.

11.6 Условия проведения хроматографического анализа

11.6.1 Подготовку хроматографа к работе проводят в соответствии с руководством по эксплуатации жидкостного хроматографа, а также с руководством по эксплуатации флуориметрического (спектрофлуориметрического) детектора.

Устанавливают рабочие параметры детектора в соответствии с рекомендациями изготовителя и выделяют требуемые спектральные диапазоны возбуждения и регистрации люминесценции (см. 5.1.1) при помощи светофильтров или монохроматоров. В последнем случае устанавливают длину волны возбуждения 365 нм и длину волны регистрации 440 нм и при наличии технической возможности оптимизируют выбранные значения (в пределах, указанных в 5.1.1 диапазонов), добиваясь максимального значения углового коэффициента градуировочной характеристики по 11.7.

11.7 Градуировка хроматографа

11.7.1 В качестве образцов для градуировки хроматографа используют растворы афлатоксина M_1 в подвижной фазе, приготовленные по 11.5.1.3. Диапазон построения градуировочной характеристики составляет от 2 до 50 нг/см^3.

11.7.2 Регистрируют не менее двух хроматограмм каждого раствора, проверяют правильность автоматической разметки и, если необходимо, корректируют ее, удаляют лишние пики.

11.7.3 Далее проводят процедуру градуировки согласно руководству пользователя программного обеспечения и определяют время удерживания и параметры градуировочной характеристики для афлатоксина M_1.

11.7.4 Градуировку считают приемлемой, если вычисляемый программой коэффициент корреляции не ниже 0,99, а относительное стандартное отклонение не превышает 5 %.

11.7.5 Внеочередная градуировка хроматографа проводится при неудовлетворительных результатах контроля ее стабильности по 11.8. Необходимость новой градуировки чаще всего возникает в следующих случаях.

- при замене стандартного образца состава раствора афлатоксина M_1;
- когда есть основания полагать, что изменилась чувствительность детектора (например, после проведения ремонта или длительного простоя хроматографа).

Примечание — Допускается использование градуировочных растворов с иными значениями массовой концентрации в диапазоне линейности градуировочной характеристики.

11.8 Контроль стабильности градуировочной характеристики

11.8.1 Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят ежедневно перед началом работы.

11.8.2 Массовую концентрацию афлатоксина M_1 для проведения контроля выбирают исходя из предполагаемого его содержания в анализируемых пробах, рекомендуется использовать раствор афлатоксина M_1 номинального значения массовой концентрации 6 нг/см^3, приготовленный по 11.5.1.4.

11.8.3 Регистрируют не менее двух хроматограмм раствора и идентифицируют пик афлатоксина M_1, внося при необходимости программную коррекцию времени удерживания.

11.8.4 Проверяют приемлемость полученных значений времен удерживания и значений массовой концентрации афлатоксина M_1 по формулам (3) и (4) соответственно.

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

где t_1 и t_2 — время удерживания пика афлатоксина M_1 на первой и второй хроматограммах соответственно, мин;

$\bar{t}$ — среднее арифметическое значений t_1 и t_2, мин;

$$|C_{к,1} - C_{к,2}| \le 0{,}05 \cdot \bar{C}_к, \quad (4)$$

где $C_{к,1}$ и $C_{к,2}$ — массовая концентрация афлатоксина M_1 в образце для контроля по первой и второй хроматограммам соответственно, нг/см^3;

$\bar{C}_к$ — среднее арифметическое значений C_1 и $C_{к2}$, нг/см^3.

11.8.5 Градуировочная характеристика признается стабильной, если выполняется условие

$$|\bar{C}_к - C| \le 0{,}1 \cdot C, \quad (5)$$

где C — действительное значение массовой концентрации афлатоксина M_1 в растворе, используемом для контроля стабильности градуировочной характеристики, нг/см^3.

11.8.6 Если условие (5) не выполняется, то процедуру контроля повторяют и при получении неудовлетворительного результата градуировку хроматографа проводят заново.

Примечание — Лаборатория вправе устанавливать собственные значения нормативов, используемых в формулах (3)—(5), при условии, что они не превышают значений, приведенных в указанных формулах.

11.9 Контроль холостой пробы

11.9.1 Анализ холостой пробы проводят до начала анализа реальных проб.

11.9.2 В чистую плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3 помещают 10 см^3 смешанного раствора хлористого натрия и лимонной кислоты (11.2) и 60 см^3 хлороформа, тщательно перемешивают и продолжают выполнять все операции по 12.1—12.3 настоящего стандарта, получая таким образом концентрат холостой пробы. Проводят хроматографический анализ полученного концентрата согласно 12.4. Если на хроматограмме присутствуют пики, по параметрам удерживания близкие к пику афлатоксина M_1, то находят и устраняют причины загрязнения холостой пробы (посуда или реактивы). Наиболее распространенной причиной загрязнения холостой пробы является недостаточная чистота используемых растворителей, поэтому при неудовлетворительном результате контроля холостой пробы контролируют используемые растворители по приложению В.

11.9.3 Контроль холостой пробы необходимо проводить для каждой новой партии реактивов.

11.10 Учет потерь афлатоксина M_1 в процессе подготовки проб

11.10.1 Для учета потерь афлатоксина M_1 в процессе подготовки проб необходимо выполнить анализ пробы продукции с введенной добавкой афлатоксина M_1. Пробы, к которым вносят добавки, не должны содержать афлатоксин M_1.

11.10.2 В зависимости от типа анализируемых проб к соответствующей навеске по таблице 5 добавляют выбранный объем раствора афлатоксина M_1 номинального значения массовой концентрации 0,02 мкг/см^3 (11.5.1.2) и проводят все операции подготовки пробы по 12.1—12.3, получая таким образом концентрат пробы, который анализируют согласно 12.4.

11.10.3 По полученным хроматограммам определяют массовую концентрацию афлатоксина M_1 в конечном концентрате, пользуясь программным обеспечением, по заложенной в метод градуировочной характеристике.

11.10.4 Затем вычисляют (η) — степень извлечения афлатоксина M_1 — по формуле

$$\eta = \frac{q_x}{C_{cm} \cdot V_{cm}}, \quad (6)$$

где C_{cm} — действительное значение массовой концентрации раствора афлатоксина M_1 по 11.5.1.1, нг/см^3;

V_{cm} — объем раствора афлатоксина M_1 взятый для приготовления пробы с введенной добавкой по таблице 3, см^3;

q_x — измеренное значение массы афлатоксина M_1, в образце, вычисленное по соответствующим формулам (7) или (8), нг.

Таблица 3 — Объем раствора афлатоксина M_1, взятый для приготовления пробы с введенной добавкой

Тип проб	Масса навески, г	Рекомендуемые для добавки объемы раствора афлатоксина M_1 массовой концентрации 0,02 мкг/см^3 (11.5.1.1), см^3
Молоко и кисломолочные продукты, творог и творожные продукты, сметана и продукты на ее основе	25	1
Сыр и сырные продукты	15	0,5
Сухие молочные продукты	5	0,2
Масло, сливочно-растительные спреды, мороженое и смеси для мороженого	7	0,2

11.10.5 Измеренное значение массы афлатоксина M_1 (q_x) для проб, подготовленных по 12.1.1—12.1.3, вычисляют по формуле

$$q_x = 30 \cdot \frac{C_x}{V_2}, \quad (7)$$

где C_x — измеренное значение массовой концентрации афлатоксина M_1 в конечном концентрате образца, нг/см^3;

V_2 — объем хлороформного экстракта, см^3, взятого для дальнейшего анализа по 12.1.1, 12.1.2 или 12.1.3.

11.10.6 Для проб, подготовленных по 12.1.4, значение массы афлатоксина M_1 вычисляют по формуле

$$q_x = 30 \quad C_x. \quad (8)$$

11.10.7 Определение коэффициента прохождения проводится на этапе освоения методики не менее двух раз. Процедуру должен выполнить каждый из операторов, работающих по данной методике.

11.10.8 При удовлетворительном проведении подготовки пробы каждое из полученных значений коэффициента прохождения афлатоксина M_1 должно быть в диапазоне от 0,60 до 0,95, причем расхождение между максимальным и минимальным значениями, полученными оператором, не должно превышать 0,1. В противном случае необходимо найти причины неудовлетворительного проведения подготовки проб и повторить процедуру определения коэффициента до получения результатов, удовлетворяющих указанному условию.

11.10.9 При удовлетворительных результатах усредняют полученные значения и найденное среднее значение используют при расчете результатов анализа по формулам (10) и (12).

11.10.10 В дальнейшем проводится контроль коэффициента прохождения афлатоксина M_1 в соответствии с периодичностью, предусмотренной в Руководстве по качеству лаборатории. Если расхождение между найденным и ранее установленным значениями превышает 0,15, то выясняют причины и заново определяют коэффициент.

Примечание — Коэффициент прохождения афлатоксина M_1 зависит от матрицы пробы.

12 Выполнение измерений

12.1 Экстракция афлатоксина M_1 из проб

12.1.1 Пробы молока и кисломолочных продуктов, творога и творожных продуктов, сметаны и продуктов на ее основе, молочных составных продуктов на их основе, молочных и молокосодержащих консервов.

12.1.1.1 В плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3 помещают 25 г отобранной по 10.2 пробы, 10 см^3 смешанного раствора хлористого натрия и лимонной кислоты по 11.2 и 60 см^3 хлороформа.

12.1.1.2 К пробе сгущенного молока перед добавлением смешанного раствора по 11.2 добавляют 20 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают.

12.1.1.3 Творог и творожные продукты растирают до однородной массы после добавления к ним смешанного раствора хлористого натрия и лимонной кислоты по 11.2.

12.1.1.4 Содержимое колбы интенсивно перемешивают в течение 5 мин, после чего переносят в центрифужные стаканы и центрифугируют при 3000 об/мин в течение от 1 до 2 мин (рекомендуется использовать четыре стакана вместимостью по 25 см^3). Центрифугат переносят в делительную воронку, отделяют хлороформный слой, собирая его в сухую плоскодонную колбу вместимостью от 100 до 250 см^3, добавляют 5—7 г безводного натрия сернокислого, встряхивают и оставляют на 10 мин. Хлороформный экстракт фильтруют через бумажный фильтр «красная лента». Затем 30 см^3 фильтрата (V_2) переносят в колбу для упаривания и упаривают от 5 см^3 до 6 см^3.

12.1.1.5 Далее проводят очистку полученного экстракта методом ТФЭ с использованием концентрирующего патрона для подготовки проб методом ТФЭ по 12.2.

12.1.2 Пробы сухих молочных продуктов

12.1.2.1 В плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3 помещают 5 г отобранной по 10.2 пробы сухого молочного продукта. Добавляют 20 см^3 дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Содержимое колбы доводят до температуры от 35 °С до 38 °С на водяной бане, при этом добиваются полного растворения продукта. Охлаждают и вносят в колбу 10 см^3 смешанного раствора хлористого натрия и лимонной кислоты (см. 11.2) и 60 см^3 хлороформа.

12.1.2.2 Содержимое колбы перемешивают 5 мин, после чего переносят в центрифужные стаканы и центрифугируют при 3000 об/мин в течение от 1 до 2 мин (рекомендуется использовать четыре стакана вместимостью по 25 см^3). Центрифугат переносят в делительную воронку, отделяют хлороформный слой, собирая его в сухую плоскодонную колбу вместимостью от 100 до 250 см^3, добавляют от 5 до 7 г безводного сернокислого натрия, встряхивают и оставляют на 10 мин. Хлороформный экстракт фильтруют через бумажный фильтр «красная лента» в мерный цилиндр вместимостью 100 см^3, собирая максимально возможный объем фильтрата (V_2). Переносят его в колбу для упаривания и упаривают от 5 до 6 см^3.

12.1.2.3 Далее проводят очистку полученного экстракта методом ТФЭ с использованием концентрирующего патрона для подготовки проб методом ТФЭ по 12.2.

12.1.3 Пробы сыра и сырных продуктов

12.1.3.1 В плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3 помещают 15 г отобранной по 10.2 пробы. Добавляют 20 см^3 дистиллированной воды и 10 см^3 смешанного раствора хлористого натрия и лимонной кислоты (см. 11.2) и тщательно перемешивают. Содержимое колбы нагревают до температуры от 35 °С до 38 °С на водяной бане, при этом добиваются полного диспергирования продукта. Охлаждают и вносят в колбу 60 см^3 хлороформа.

12.1.3.2 Содержимое колбы перемешивают 30 мин, после чего в делительной воронке отделяют хлороформный слой (допускается отцентрифугировать осадок), собирая его в сухую плоскодонную колбу вместимостью от 100 см^3 до 250 см^3. Добавляют 5—7 г безводного сернокислого натрия, встряхивают и оставляют на 10 мин. Хлороформный экстракт фильтруют через бумажный фильтр «красная лента». Затем 30 см^3 фильтрата V_2 переносят в колбу для упаривания и упаривают от 5 см^3 до 6 см^3.

12.1.3.3 Далее проводят очистку полученного экстракта методом ТФЭ с использованием концентрирующего патрона для подготовки проб методом ТФЭ по 12.2.

12.1.4 Пробы масла, масляной пасты, сливочно-растительного спреда, мороженого и смесей для мороженого

12.1.4.1 В плоскодонную колбу вместимостью 100 см^3 помещают 7 г отобранной по 10.2 пробы и расплавляют ее на водяной бане с температурой 40 °С. В колбу вносят 0,2 г хлористого натрия, 30 см^3 ацетонитрила, тщательно перемешивают, затем добавляют 15 см^3 гексана по нормативной документации, действующей на территории государства, принявшего настоящий стандарт. Содержимое колбы перемешивают в течение 30 мин, после чего переносят в делительную воронку, отделяют нижний (ацетонитрильный) слой, собирая его в плоскодонную колбу или цилиндр вместимостью от 50 до 100 см^3, а верхний (гексановый) слой отбрасывают.

12.1.4.2 Затем проводят обезжиривание ацетонитрильного слоя в делительной воронке гексаном (соответствующим нормативной документации, действующей на территории государства, принявшего настоящий стандарт) (3 порции по 10 см^3), после чего ацетонитрильный экстракт фильтруют через

бумажный фильтр «красная лента», заполненный 3 г безводного сернокислого натрия, в колбу для упаривания. Осушитель и фильтр промывают от 5 $см^3$ до 10 $см^3$ ацетонитрила, присоединяя его к фильтрату. Экстракт упаривают в вакууме лабораторного насоса досуха, поместив сосуд на водяную баню при температуре от 40 °С до 50 °С. Сухой остаток растворяют в хлороформе от 5 до 6 $см^3$. Далее проводят очистку полученного экстракта методом твердофазной экстракции (ТФЭ) с использованием концентрирующего патрона для подготовки проб методом ТФЭ по 12.2.

12.2 Проведение очистки экстракта методом ТФЭ с использованием концентрирующего патрона для подготовки проб методом ТФЭ

12.2.1 Монтируют установку для проведения подготовки пробы методом твердофазной экстракции, например показанную на рисунке 1, предварительно сняв с концентрирующего патрона заглушки.

Примечание — Допускается использование иных установок для проведения очистки методом ТФЭ при условии, что их применение обеспечивает выполнение требований к коэффициенту прохождения афлатоксина M_1 по 11.10.8.

12.2.2 Включают слабый вакуум и пропускают через патрон 5 $см^3$ обезвоженного хлороформа. Не допуская попадания воздуха, наносят на патрон хлороформный экстракт, полученный по 12.1, быстро ополаскивают колбу для упаривания от 2 $см^3$ до 3 $см^3$ хлороформа и также наносят на патрон. Расход жидкости не должен превышать 5 $см^3$/мин (быстрые капли), затем промывают патрон 5 $см^3$ гексана для удаления жиров. Элюаты отбрасывают. Хлороформ предварительно должен быть осушен безводным натрием сернокислым.

12.2.3 Подсоединяют чистую колбу для отгонки растворителя и элюируют афлатоксин M_1 12 $см^3$ смеси хлороформ-ацетон (4:1) по 11.4. Расход элюента должен быть не более 5 $см^3$/мин. Элюат упаривают в вакууме лабораторного насоса досуха при температуре водяной бани не более 45 °С.

Примечание — Приведенные в 12.2.2 и 12.2.3 значения объемов растворителей и скорости элюирования являются рекомендательными, поскольку они зависят от типа применяемого патрона. Пользователь настоящего стандарта должен проверить их применимость для применяемых патронов и при необходимости оптимизировать их. Критерием приемлемости применяемой процедуры является выполнение требований к коэффициенту прохождения афлатоксина M_1 по 11.10.

12.3 Подготовка к хроматографическому анализу

12.3.1 К сухому остатку, полученному по 12.2, добавляют 50 $мм^3$ трифторуксусной кислоты, тщательно перемешивают, выдерживают 5 мин в колбе, закрытой стеклянной пришлифованной пробкой. Затем остаток кислоты отгоняют в вакууме досуха, до исчезновения запаха трифторуксусной кислоты, растворяют сухой остаток в 0,5 $см^3$ подвижной фазы, перемешивают и выдерживают не менее 5 мин в закрытом сосуде.

12.3.2 Затем добавляют 2 $см^3$ гексана и снова интенсивно перемешивают. Ждут расслоения двух несмешивающихся между собой фаз и аккуратно, при помощи пипетки вместимостью 1 $см^3$ или одноканального пипеточного дозатора от 100 $мм^3$ до 1000 $мм^3$, переносят 0,3 $см^3$ нижнего слоя в пробирку для микропроб однократного применения вместимостью 1,5 $см^3$. Полученный концентрат используют для хроматографического анализа в течение рабочего дня.

Примечание — Допускается проводить элюирование афлатоксина M_1 вручную, с использованием штока медицинского шприца. Допускается растворять сухой остаток в ином объеме подвижной фазы от 0,5 до 5 $см^3$, в зависимости от ожидаемой концентрации афлатоксина M_1, учитывая данный объем V_3 в формулах (10) и (12).

12.4 Проведение хроматографических измерений

12.4.1 Регистрируют не менее двух хроматограмм концентрата, полученного по 12.3, в тех же условиях, при которых была проведена градуировка хроматографа. Идентификацию афлатоксина M_1 в пробе проводят средствами программного обеспечения по совпадению времени удерживания афлатоксина M_1 в реальной пробе с его временем удерживания, полученным при контроле стабильности градуировочной характеристики (11.10), установив ширину окна идентификации 5 %.

12.4.2 Определяют содержание афлатоксина M_1 в концентрате по каждой зарегистрированной хроматограмме и проверяют приемлемость полученных значений, используя неравенство (4).

12.4.3 Если неравенство (4) выполняется, то в качестве результата измерений массовой концентрации анализируемого компонента в концентрате принимают среднее арифметическое полученных значений. Если неравенство (4) не выполняется, находят и устраняют причины нестабильности, после чего ввод концентрата пробы повторяют.

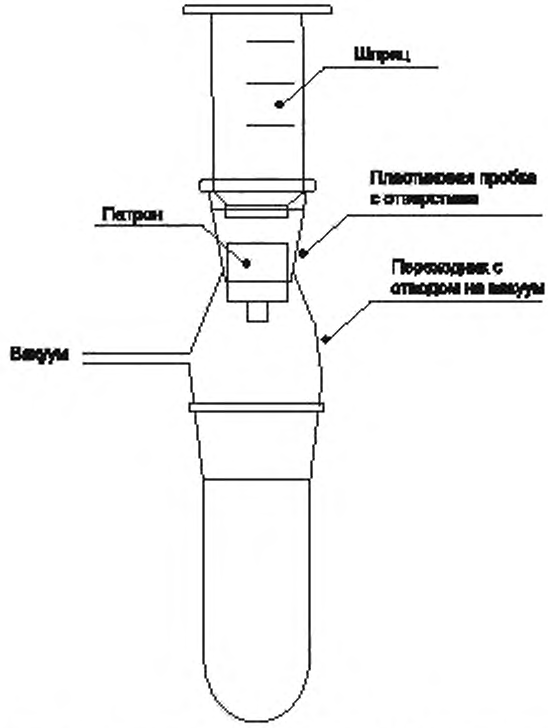

Рисунок 1 — Схема установки для проведения очистки методом ТФЭ с использованием концентрирующего патрона для подготовки проб методом ТФЭ

12.4.4 При необходимости подтверждения правильности идентификации пика афлатоксина M_1 рекомендуется выполнить добавку раствора афлатоксина M_1 в подвижной фазе (см. 11.5.1.3) к концентрату пробы. О достоверности идентификации можно судить по увеличению высоты предполагаемого пика афлатоксина M_1. Величина добавки должна составлять от 50 % до 150 % от найденного значения массовой концентрации афлатоксина M_1 в концентрате пробы.

12.4.5 Если содержание афлатоксина M_1 в конечном концентрате (C_x) превышает 50 нг/см^3, то концентрат необходимо разбавить подвижной фазой (см. 11.3).

Коэффициент разбавления Q вычисляют по формуле

$$Q = \frac{V_p}{V_a}, \quad (9)$$

где V_p — объем разбавленного концентрата пробы, см^3;

V_a — объем аликвотной порции исходного концентрата пробы, взятый для разбавления, см^3.

13 Обработка результатов измерений

13.1 Массовую долю афлатоксина M_1 в пробе X, мг/кг, вычисляют по формулам:

- для проб молока и молокосодержащих продуктов, подготовленных по 12.1.1—12.1.3, используют формулу

$$X = \frac{V_1 \cdot V_3 \cdot C_x}{V_2 \cdot m \cdot \eta \cdot 1000} \cdot Q, \quad (10)$$

где C_x — измеренное значение массовой концентрации афлатоксина M_1 в концентрате пробы, нг/см^3;

V_1 — объем хлороформа, взятого для экстракции (60 см^3);

V_2 — объем хлороформного экстракта, взятого для дальнейшего анализа, см^3, по 12.1.1, 12.1.2 или 12.1.3;

V_3 — объем концентрата пробы, см^3;

m — масса пробы, г;

η — степень извлечения афлатоксина M_1 (см. 11.10.4);

Q — коэффициент разбавления концентрата пробы (см. 12.4);

1000 — коэффициент согласования размерности единиц массы.

13.2 При необходимости расчета массовой доли афлатоксина M_1 в сухом молоке в пересчете на восстановленный продукт $X_{вос}$, мг/кг, используют формулу

$$X_{вос} = \frac{X \cdot m_1}{m_1 + m_2}, \quad (11)$$

где X — массовая доля афлатоксина M_1 в пробе, рассчитанная по формуле (10), мг/кг;

m_1 — масса сухого молока, использованного для приготовления восстановленного продукта, г;

m_2 — масса воды, используемой для приготовления восстановленного продукта, г;

Для проб масла, масляной пасты, сливочно-растительного спреда, мороженого и смесей для мороженого, подготовленных по 12.1.4, используют формулу

$$X = \frac{V_3 \cdot C_x}{m \cdot \eta \cdot 1000} \cdot Q, \quad (12)$$

где C_x — измеренное значение массовой концентрации афлатоксина M_1 в концентрате, нг/см^3;

V_3 — объем конечного концентрата пробы, см^3;

m — масса пробы, г;

η — степень извлечения афлатоксина M_1 (см. 11.10.4);

Q — коэффициент разбавления концентрата пробы (см. 12.4);

1000 — коэффициент согласования размерности единиц массы.

Примечание — При степени извлечения более 0,9 допускается не учитывать ее в формулах (10) и (12).

14 Оформление результатов измерений

14.1 Результат измерения (X) в документах, предусматривающих его использование, может быть представлен в виде:

$X \pm \Delta$, мг/кг, $P = 0,95$ по формуле (13).

где X — единичный результат измерений, мг/кг;

Δ — показатель точности методики (границы абсолютной погрешности при вероятности $P = 0,95$ для $n = 1$), мг/кг:

$$\Delta = \frac{\delta \cdot X}{100}. \quad (13)$$

Значение δ приведено в таблице 1.

14.2 Допускается результат измерения в документах, выдаваемых лабораторией, представлять в виде:

$$X \pm \Delta_л, \text{ мг/кг, при } P = 0,95, \quad (14)$$

где $\Delta_л$ — значение характеристики погрешности результатов измерений, установленное при реализации методики в лаборатории для единичного результата и обеспечиваемое контролем стабильности результатов измерений, мг/кг.

15 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

15.1 Общие положения

15.1.1 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории предусматривает:

- оперативный контроль процедуры анализа на основе оценки приемлемости результатов в условиях повторяемости и оценки погрешности при реализации отдельно взятой контрольной процедуры;
- контроль стабильности результатов измерений на основе контроля стабильности среднего квадратического отклонения (СКО) повторяемости, СКО промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности и погрешности.

15.1.2 Периодичность контроля исполнителем процедуры выполнения измерений на основе оценки приемлемости результатов в условиях повторяемости и оценки погрешности измерений при реализации отдельной контрольной процедуры, а также реализуемые процедуры контроля стабильности результатов измерений регламентируются в Руководстве по качеству лаборатории.

15.2 Контроль приемлемости результатов в условиях повторяемости

15.2.1 Контроль приемлемости результатов, получаемых в условиях повторяемости, проводится путем выборочного контроля с использованием проб продукции, анализируемых по методике.

15.2.2 Анализируют две навески пробы в условиях повторяемости (один и тот же оператор, использующий один и тот же набор посуды и стандартный образец в течение короткого промежутка времени) и получают два результата параллельных определений.

15.2.3 Расхождение между двумя полученными результатами не должно превосходить предела повторяемости по формуле

$$X_{max} - X_{min} \le 0{,}01 \cdot \overline{X} \cdot r, \quad (15)$$

где X_{max} — больший результат параллельного определения, мг/кг;

X_{min} — меньший результат параллельного определения, мг/кг;

$\overline{X}$ — среднее арифметическое результатов параллельных определений, мг/кг;

r — значение предела повторяемости по таблице 4, %.

15.2.4 При невыполнении неравенства (15) процедуру контроля повторяют. При повторном неудовлетворительном результате находят и устраняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам.

Таблица 4 — Значение предела повторяемости

Диапазон измерений*, мг/кг	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между результатами параллельных определений), r, %
От 0,00002 до 0,0005 включ.	22
* 1 мг/кг соответствует 1 млн$^{-1}$.	

15.3 Контроль исполнителем процедуры выполнения измерений

15.3.1 Оперативный контроль процедуры измерений может быть выполнен по двум алгоритмам — с использованием стандартных образцов и с использованием метода добавок.

15.3.1.1 Оперативный контроль процедуры измерений с использованием стандартных образцов состава продукции

15.3.1.2 Оперативный контроль процедуры измерений проводят путем сравнения результата отдельно взятой контрольной процедуры $K_к$ с нормативом контроля K_0.

15.3.1.3 В качестве образцов для контроля используют в порядке понижения приоритетности:

- стандартные образцы состава анализируемых объектов с аттестованными значениями массовой доли афлатоксина M_1;
- образцы, в которых массовая доля афлатоксина M_1 установлена по результатам межлабораторных испытаний;
- образцы, многократно проанализированные в лаборатории.

Только при невозможности использования таких образцов используют процедуру контроля по методу добавок по 15.3.2.

15.3.1.4 Анализируют пробу образца для контроля в точном соответствии с 12 и рассчитывают результат контрольной процедуры $K_к$ по формуле

$$K_к = |X - C_0|, \quad (16)$$

где X — результат контрольного измерения массовой доли афлатоксина M_1 в стандартном образце (см. 12), мг/кг;

C_0 — аттестованное значение массовой доли афлатоксина M_1 в стандартном образце, мг/кг.

15.3.1.5 Норматив контроля K_0 рассчитывают по формуле

$$K_0 = \Delta_{л,\,х}, \quad (17)$$

где $\Delta_{л,\ X}$ — показатели точности результатов измерений (границы абсолютной погрешности измерений для вероятности $P = 0,95$), установленные в лаборатории при реализации методики, соответствующие содержанию афлатоксина M_1 в стандартном образце, мг/кг.

15.3.1.6 Если в лаборатории установлены границы относительной погрешности $\delta_{л,\ X}$, то значение $\Delta_{л,\ X}$ вычисляют по формуле

$$\Delta_{л,\ X} = 0,01 \cdot \delta_{л,\ X} \cdot X. \quad (18)$$

15.3.1.7 Качество контрольной процедуры признают удовлетворительным при выполнении условия

$$K_к \le K_d. \quad (19)$$

15.3.1.8 Если значение $\Delta_{л,\ X}$, вычисляемое по формуле (18), не выполняется, то процедуру контроля повторяют. При повторном невыполнении этого условия выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

15.3.2 Контроль исполнителем процедуры выполнения измерений с использованием метода добавок.

15.3.2.1 Оперативный контроль процедуры выполнения измерений проводят путем сравнения результата отдельно взятой контрольной процедуры $K_к$ с нормативом контроля K_d.

15.3.2.2 Образцами для контроля являются пробы продукции, анализируемые по данной методике. Отбирают две пробы и к одной из них добавляют такой объем раствора афлатоксина M_1, чтобы его массовая доля в образце увеличилась по сравнению с исходным значением от 50 % до 150 %. Если содержание афлатоксина M_1 в исходной пробе меньше нижней границы диапазона измерений (0,0002 мг/кг), то величина добавки должна в 2—3 раза превышать нижнюю границу диапазона измерений.

15.3.2.3 Величину добавки C_d, мг/кг, рассчитывают по формуле

$$C_d = \frac{C_0 \ V_0}{m}, \quad (20)$$

где C_0 — массовая концентрация афлатоксина M_1 в растворе, использованном для внесения добавки, мкг/см^3;

V_0 — объем раствора афлатоксина M_1(аттестованной смеси), внесенного в качестве добавки, см^3;

m — масса пробы, г.

15.3.2.4 Результат контрольной процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле

$$K_к = |X' - X - C_d|, \quad (21)$$

где X — результат контрольного измерения массовой доли афлатоксина M_1 в рабочей пробе (см. 12), мг/кг;

X' — результат контрольного измерения массовой доли афлатоксина M_1 в рабочей пробе с известной добавкой (см. 12), мг/кг;

C_d — величина добавки афлатоксина M_1 по формуле (20), мг/кг.

15.3.2.5 Норматив контроля K_d рассчитывают по формуле

$$K_d = \sqrt{\left(\Delta_{л,X}\right)^2 + \left(\Delta_{л,X'}\right)^2}, \quad (22)$$

где $(\Delta_{л,X})^2$ и $(\Delta_{л,X'})^2$ — показатели точности результатов измерений (границы абсолютной погрешности измерений для вероятности $P = 0,95$), установленные в лаборатории при реализации методики, соответствующие содержанию афлатоксина M_1 в рабочей пробе и в пробе с добавкой соответственно, мг/кг.

15.3.2.6 Если в лаборатории установлены границы относительной погрешности ($\delta_{л,X}$ *и* $\delta_{л,X'}$), то значения ($\Delta_{л,X}$) и ($\Delta_{л,X'}$) вычисляют по формулам

$$\Delta_{л,X} = 0,01 \cdot \delta_{л,X} \cdot X;\ \Delta_{л,X'} = 0,01 \cdot \delta_{л,X'} \cdot X'. \quad (23)$$

15.3.2.7 Качество контрольной процедуры признают удовлетворительным при выполнении условия

$$K_к \le K_d. \quad (24)$$

15.3.2.8 Если неравенство (24) не выполняется, то процедуру контроля повторяют. При повторном невыполнении этого условия выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

Примечание — Допустимо показатели точности измерений при внедрении методики в лаборатории устанавливать на основе выражения $\Delta_п = 0,84 - \Delta$ (значения Δ вычисляют по формуле (13) с последующим уточнением по мере накопления информации в процессе контроля стабильности результатов измерений).

16 Проверка приемлемости результатов, получаемых в условиях воспроизводимости

16.1 Расхождение между результатами, полученными в двух лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости, т. е. должно выполняться неравенство (25)

$$|X_1 - X_2| \le 0,01 \cdot \overline{X} \cdot R, \qquad (25)$$

где X_1 и X_2 — результаты измерений, полученные в условиях воспроизводимости (в разных лабораториях), мг/кг;

$\overline{X}$ — среднее арифметическое значений X_1 и X_2, мг/кг;

R — значение предела воспроизводимости по таблице 5, %.

16.2 При выполнении этого условия приемлемы оба результата измерений, и в качестве окончательного может быть использовано их среднее значение.

16.3 При превышении предела воспроизводимости могут быть использованы методы оценки приемлемости результатов измерений согласно разделу 5 ГОСТ ИСО 5725-6—2003.

Таблица 5 — Значение предела воспроизводимости

Диапазон измерений, мг/кг	Предел воспроизводимости R (для двух результатов измерений, $P = 0,95$), %
От 0,00002 до 0,0005 включ.	45

Приложение А
(обязательное)

Требования безопасности при работе с афлатоксинами

А.1 Афлатоксины — очень токсичные и канцерогенные вещества. Поэтому для работы с ними необходимы определенные условия и строгое соблюдение ряда правил безопасности.

А.2 Сосуды, содержащие афлатоксины, подлежат маркировке обозначением «ЯД» и в целях исключения загрязнения рабочего места должны находиться в стаканах или других емкостях. Рабочее место с той же целью нужно покрыть листом фильтровальной бумаги, которая после работы переносится в герметичный мешок или контейнер для последующего сжигания.

А.3 В случае попадания афлатоксина на лабораторное оборудование и предметы их деконтаминацию следует проводить тщательной обработкой 5—10%-ным раствором хлорамина, а затем 1%-ным раствором гидрокарбоната натрия.

А.4 Работать с афлатоксинами следует в халате, резиновых перчатках. Перчатки после работы необходимо обработать раствором хлорамина и тщательно промыть проточной водой.

А.5 В случае попадания афлатоксинов на открытые участки тела, в глаза, на слизистую рта и носа необходимо их немедленно и тщательно промыть 1 %-ным раствором борной кислоты, а затем проточной водой.

А.6 Посуда, находившаяся в контакте с афлатоксинами, подлежит тщательной обработке путем заполнения ее на 12 ч деконтаминационным раствором следующего состава: 250 г гидроксида натрия, 100 г хлорамина, 10 г стирального порошка, 5 л воды. После такой деконтаминации посуду моют общепринятым способом.

Приложение Б
(справочное)

Определение афлатоксина M_1 в молоке без обработки трифторуксусной кислотой

Б.1 Допускается проводить определение массовой доли афлатоксина M_1 в молоке и кисломолочных продуктах без его перевода в интенсивно флуоресцирующее соединение обработкой трифторуксусной кислотой.

Б.2 Общий порядок проведения измерений изложен в тексте настоящего стандарта. В настоящем приложении описаны особенности приготовления градуировочных растворов, проведения градуировки хроматографа, контроля стабильности градуировочной характеристики и выполнения измерения.

Б.3 Приготовление градуировочных растворов афлатоксина M_1 в подвижной фазе номинального значения массовой концентрации 50; 10; 5 нг/см^3.

Б.3.1 В колбу для упаривания помещают указанное в таблице 2 (см. 11.5.1.3) количество раствора афлатоксина M_1 номинального значения массовой концентрации 0,02 мкг/см^3 (см. 11.5.1.1), удаляют растворитель упариванием в вакууме при температуре от 40 °С до 45 °С.

Б.3.2 Сухой остаток растворяют в соответствующем объеме подвижной фазы (см. 11.2), перемешивают и выдерживают перед измерениями не менее 10 мин в закрытом сосуде. Действительное значение массовой концентрации растворов вычисляют по формуле (2).

Растворы используют в течение 1 ч.

Б.4 Приготовление проверочного раствора афлатоксина M_1 в подвижной фазе номинального значения массовой концентрации 12 нг/см^3.

Б.4.1 В колбу для упаривания помещают 1 см^3 раствора афлатоксина M_1 номинального значения массовой концентрации 0,006 мкг/см^3 (см. 11.5.1.2), удаляют растворитель упариванием в вакууме. Сухой остаток растворяют в 0,5 см^3 подвижной фазы (см. 11.3), перемешивают и выдерживают перед измерениями не менее 10 мин в закрытом сосуде. Действительное значение массовой концентрации раствора вычисляют по формуле (2).

Б.5 Градуировка хроматографа. Контроль стабильности градуировочной характеристики.

Б.5.1 В качестве образцов для градуировки хроматографа используют растворы афлатоксина M_1 в подвижной фазе, приготовленные по Б.3. Диапазон построения градуировочной характеристики составляет от 5 до 50 нг/см^3.

Б.5.2 Для градуировки хроматографа выполняют все операции по 11.9.

Б.5.3 Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят ежедневно перед началом работы.

Б.5.4 Массовую концентрацию афлатоксина M_1 для проведения контроля выбирают исходя из предполагаемого его содержания в анализируемых пробах; рекомендуется использовать раствор афлатоксина M_1 номинального значения массовой концентрации 12 нг/см^3, приготовленный по Б.4.

Б.5.5 Для контроля стабильности градуировочной характеристики выполняют все операции по 11.9.

Б.6 Выполнение измерений

Б.6.1 Экстракция афлатоксина M_1 из проб и проведение очистки экстракта на концентрирующем патроне для подготовки проб методом ТФЭ.

Б.6.2 Экстракцию афлатоксина M_1 из проб проводят в соответствии с 12.1 в зависимости от типа проб. Очистку полученного экстракта проводят в соответствии с 12.2.

Б.6.3 Подготовка к хроматографическому анализу

Б.6.4 К сухому остатку, полученному по Б.6.1, добавляют 0,5 см^3 подвижной фазы, перемешивают и выдерживают не менее 5 мин в закрытом сосуде.

Примечание — Допускается растворять сухой остаток в ином объеме подвижной фазы от 0,5 до 5 см^3, в зависимости от ожидаемой концентрации афлатоксина M_1, учитывая этот объем V_3 в формулах (10), (12).

Б.6.5 Затем добавляют 2 см^3 гексана и снова интенсивно перемешивают. Ждут расслоения двух не смешивающихся между собой фаз и аккуратно, при помощи градуированной пипетки вместимостью 1 см^3 или одноканального пипеточного дозатора от 100 до 1000 мм^3, переносят примерно 0,3 см^3 нижнего слоя в пробирку для микропроб однократного применения вместимостью 1,5 см^3. Полученный концентрат используют для хроматографического анализа по 12.4 в течение 1 ч.

Б.6.6 Обработку и оформление полученных результатов проводят в соответствии с разделами 13, 14 настоящего стандарта.

Приложение В
(справочное)

Контроль чистоты растворителей

В.1 При контроле пригодности растворителей (ацетона, гексана, хлороформа) для выполнения определения афлатоксина M_1 в колбу для упаривания отбирают растворитель в объеме, равном суммарному объему данного растворителя, используемого при обработке пробы, и упаривают досуха. Проводят подготовку пробы к анализу по 12.3 и проводят хроматографический анализ полученного раствора согласно 12.4.

В.2 Растворитель считается пригодным, если на хроматограмме отсутствуют пики, по параметрам удерживания близкие к пику афлатоксина M_1.

В.3 В противном случае растворитель необходимо заменить или подвергнуть тщательной перегонке, предварительно выдержав его над активированным углем. В сосуд с растворителем добавляют активированный уголь из расчета 10 г на 1 $дм^3$ растворителя, смесь тщательно перемешивают и оставляют от 8 ч до 12 ч. Растворитель переносят в колбу для перегонки через фильтр «красная лента» и перегоняют, собирая среднюю фракцию с температурой кипения от 56 °С до 57 °С (ацетон), от 68 °С до 69 °С (гексан) или от 60 °С до 62 °С (хлороформ).

УДК 621.3.089.6 МКС 17.020

Ключевые слова: пищевые продукты, определение содержания, афлатоксин M_1, молоко и кисломолочные продукты, пищевая промышленность, высокоэффективная жидкостная хроматография

БЗ 1—2020/99

Редактор *В.Н.Шмельков*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 27.12.2019. Подписано в печать 29.01.2020 Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,52.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва. Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
www.gostinfo.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru