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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ EN 14176— 2022

ПРОДУКЦИЯ РЫБНАЯ ПИЩЕВАЯ

Определение домоевой кислоты в непереработанных двустворчатых моллюсках, рыбе и готовых к употреблению мидиях методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием ультрафиолетового детектирования

(EN 14176:2017, Foodstuffs — Determination of domoic acid in raw shellfish, raw finfish and cooked mussels by RP-HPLC using UV detection, IDT)

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2025

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 РАЗРАБОТАН научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС) на основе собственного перевода на русский язык немецкоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации по результатам голосования в АИС МГС (протокол от 29 апреля 2022 г. № 150-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узбекское агентство по техническому регулированию

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 24 ноября 2025 г. № 1467-ст межгосударственный стандарт ГОСТ EN 14176—2022 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 30 ноября 2026 г. с правом досрочного применения

5 Настоящий стандарт идентичен европейскому стандарту EN 14176:2017 «Продукты пищевые. Определение домоевой кислоты в сырых моллюсках, сырой рыбе и вареных мидиях методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием УФ-детектирования» («Lebensmittel — Bestimmung von Domoinsäure in rohen Schalentieren, rohen Fischen und gekochten Miesmuscheln mit RP-HPLC und UV-Detektion», IDT).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного европейского стандарта для увязки с наименованиями, принятыми в существующем комплексе межгосударственных стандартов.

Европейский стандарт разработан Техническим комитетом по стандартизации CEN/TC 275 «Анализ пищевых продуктов. Горизонтальные методы» Европейского комитета по стандартизации (CEN).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочного европейского стандарта соответствующий ему межгосударственный стандарт, сведения о котором приведены в дополнительном приложении ДА

6 ВЗАМЕН ГОСТ EN 14176—2015

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 будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2025

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 Сущность метода 1
4 Реактивы 2
5 Оборудование 3
6 Методика проведения испытания 4
7 Обработка результатов 6
8 Прецизионность 7
9 Протокол испытания 7
Приложение А (справочное) Данные по прецизионности методов 8
Приложение В (справочное) Типовая хроматограмма 11
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочного европейского стандарта межгосударственному стандарту 12
Библиография 13

Введение

Вызывающий отравление амнестический яд моллюсков (ASP), или домоевая кислота (DA), принадлежит к группе аминокислот, известных как каиноиды, которые классифицируются как нейровозбудители или экзотоксины, так как они оказывают влияние на механизмы нейропередачи головного мозга. Моллюски могут накапливать данный яд, питаясь различными токсичными видами водорослей Pseudo-nitzschia. Употребление человеком пищевой рыбной продукции, содержащей домоевую кислоту, может привести к отравлению, симптомами которого являются: спазмы в животе, рвота, дезориентация и потеря памяти (амнезия), при этом отравления в некоторых случаях могут иметь серьезные последствия для здоровья.

Высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) стала первым химико-аналитическим методом, используемым для определения домоевой кислоты, и до сих пор является наиболее широко используемым методом для мониторинга моллюсков. Обнаружение домоевой кислоты осуществимо за счет ее поглощения при длине волны 242 нм [1].

Настоящий стандарт основан на двух сопоставимых методах проведения испытаний. Один метод количественного определения домоевой кислоты и ее изомеров, например эпидомоевой кислоты (epi-DA), в непереработанных морепродуктах (метод А) описан в [2]. Другой метод количественного определения домоевой кислоты и ее изомеров, например, эпидомоевой кислоты, в готовых к употреблению мидиях (метод В) описан в [3].

Метод А включает одноступенчатую экстракцию с использованием 50 %-ного водного раствора метанола, селективную очистку (по желанию) и концентрирование методом твердофазной экстракции (SPE) с использованием сильного анионообменника. С учетом результатов процедуры валидации необязательный этап очистки метода А, описанный в [2], в настоящем стандарте не описан. Аналиты определяют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в условиях изократического элюирования и детектирования в ультрафиолетовой области спектра.

Метод В включает одноступенчатую экстракцию с использованием 50 %-ного водного раствора метанола и по желанию нагревание, позволяющее лучше декантировать надосадочную жидкость. Однако следует обратить внимание, что нагревание может вызвать распад домоевой и эпидомоевой кислот. Домоевую и эпидомоевую кислоты определяют при помощи ВЭЖХ с бинарным градиентом, а также с детектированием ультрафиолетового поглощения.

Оба метода могут быть использованы для количественного определения домоевой кислоты.

Предупреждение — Применение настоящего стандарта может быть связано с использованием опасных материалов и оборудования, проведением опасных операций. В задачи настоящего стандарта не входит решение всех вопросов безопасности, связанных с его применением. Ответственность за соблюдение техники безопасности и установление необходимых ограничений при применении настоящего стандарта несет его пользователь.

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

ПРОДУКЦИЯ РЫБНАЯ ПИЩЕВАЯ

Определение домоевой кислоты в непереработанных двустворчатых моллюсках, рыбе и готовых к употреблению мидиях методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием ультрафиолетового детектирования

Fish food products. Determination of domoic acid in unprocessed bivalve molluscs, fish and cooked mussels by reversed-phase high-performance liquid chromatography using ultraviolet detection

Дата введения — 2026—11—30
с правом досрочного применения

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает методы количественного определения домоевой кислоты в непереработанных двустворчатых моллюсках и рыбе, а также в готовых к употреблению мидиях. В зависимости от чувствительности УФ-детектора предел обнаружения составляет от 10 до 80 нг/см^3 (от 0,05 до 0,4 мг/кг). Метод А был валидирован для определения домоевой кислоты в различных непереработанных матрицах, таких как мидии, венериды, морские гребешки и анчоусы, искусственно загрязненных и/или загрязненных естественно в диапазоне от 2,7 до 85,1 мг/кг. Метод В был валидирован для определения домоевой кислоты в диапазоне от 5 до 12,9 мг/кг в готовых к употреблению голубых мидиях.

Дополнительная информация о валидации методов приведена в разделе 8 и приложении А.

Практика применения метода в лаборатории показала, что настоящий стандарт может быть применен к другим видам моллюсков, однако до настоящего времени не проведена полная валидация в соответствии с ISO 5725.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использована нормативная ссылка на следующий стандарт [для датированной ссылки применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированной — последнее издание (включая все изменения)].

EN ISO 3696, Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

3 Сущность метода

Домоевую и эпидомоевую кислоты экстрагируют из пробы смесью метанола и воды. Экстракт фильтруют через мембранный фильтр и испытания проводят с помощью установки ВЭЖХ с изократическим (метод А) или градиентным (метод В) элюированием и детектированием в ультрафиолетовой области спектра. Содержание домоевой кислоты рассчитывают по градуировочному графику методом внешнего стандарта.

Предупреждение — Амнестические яды моллюсков являются сильными нейротоксинами, которые могут поступать в организм пероральным или ингаляционным путем. Поэтому необходимо принять соответствующие защитные меры.

Издание официальное

4 Реактивы

Для проведения анализа, если не указано иное, используют воду только первой степени чистоты по EN ISO 3696.

Если не указано иное, все химические вещества должны быть чистыми для анализа (ч. д. а.).

Допускается использовать аналогичные стандартные материалы (сертифицированные, при возможности) или вещества при условии их однозначной идентификации и точно установленной массовой доле основного вещества.

Лаборатория должна определить стабильность растворов при отсутствии соответствующей информации.

4.1 **Метанол**, пригодный для ВЭЖХ.

4.2 **Ацетонитрил**, пригодный для ВЭЖХ.

4.3 **Растворитель для экстракции**, метанол/вода в соотношении 50 : 50 по объему.

4.4 **Ацетонитрил/вода** в соотношении 10 : 90 по объему (метод А).

4.5 **Трифторуксусная кислота (TFA)** для спектрофотометрии с содержанием основного вещества ≥99 % (метод А).

4.6 **Муравьиная кислота** с содержанием основного вещества ≥98 % (метод В).

4.7 Элюенты

4.7.1 Элюент 1 (для изократического элюирования)

10 %-ный водный ацетонитрил по объему (см. 4.4) с 0,1 %-ной трифторуксусной кислотой по объему (см. 4.5). Для однонасосного варианта системы ВЭЖХ смешивают 100 см^3 ацетонитрила и около 400 см^3 воды, добавляют 1,0 см^3 трифторуксусной кислоты и разбавляют водой до 1 дм^3.

4.7.2 Элюент 2 (для градиентного элюирования)

100 см^3 ацетонитрила (см. 4.2) смешивают с 900 см^3 воды и доводят pH до 2,5 с помощью муравьиной кислоты (см. 4.6).

4.7.3 Элюент 3 (градиентного элюирования)

300 см^3 ацетонитрила (см. 4.2) смешивают с 700 см^3 воды и доводят pH до 2,5 с помощью муравьиной кислоты (см. 4.6).

4.8 Стандартные вещества

4.8.1 Домоевая кислота, сертифицированный градуировочный раствор[1)]

Герметичные ампулы следует хранить в темноте в холодильнике (при температуре около 4 °С). Раствор не должен замерзать. Перед открытием каждую ампулу следует выдержать при комнатной температуре. После вскрытия ампулы с помощью мерного оборудования отбирают точные аликвотные части и как можно быстрее переносят их во флакон для ВЭЖХ из темного стекла для разбавления и/или анализа. Закрытые флаконы для ВЭЖХ следует хранить в темноте в холодильнике (при температуре около 4 °С) не более 3 мес.

Примечание — Эпидомоевая кислота присутствует в низких концентрациях в сертифицированном градуировочном растворе домоевой кислоты, разработанном Институтом морских биологических наук Национального исследовательского совета Канады, Галифакс, Новая Шотландия — Канада[1)].

4.8.2 Домоевая кислота, кристаллический порошок с содержанием основного вещества >95 %.

4.9 Стандартные растворы

4.9.1 Общие положения

Используют имеющиеся в продаже сертифицированные градуировочные растворы (см. 4.8.1) или готовят градуировочные растворы путем растворения кристаллического порошка домоевой кис-

---

[1)] Информацию о подходящих градуировочных растворах можно найти, например, по ссылкам:

gost.e-ecolog.ru и

gost.e-ecolog.ru

Данная информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой CEN указанной продукции, упомянутой на веб-страницах или доступной в Канаде. Допускается использовать аналогичную продукцию при условии обеспечения идентичных результатов.

лоты (см. 4.8.2) с последующим его разбавлением. Было установлено, что оба способа приготовления градуировочных растворов приводят к успешным данным валидации.

4.9.2 Основной раствор

Кристаллический порошок домоевой кислоты (см. 4.8.2) взвешивают (см. 5.1) в мерной колбе и растворяют в метаноле до конечной концентрации 500 мкг/см^3. Закрытые колбы следует хранить в темноте в холодильнике (при температуре около 4 °С).

4.9.3 Стандартный раствор

Основной раствор (см. 4.9.2) разбавляют метанолом до конечной концентрации 50 мкг/см^3. Проверяют массовую концентрацию этого раствора путем сравнения с сертифицированными градуировочными растворами (см. 4.8.1).

4.9.4 Градуировочные растворы

Градуировочные растворы с соответствующими массовыми концентрациями домоевой и эпидомоевой кислот готовят путем разбавления стандартного (см. 4.9.3) или сертифицированного градуировочного раствора (см. 4.8.1).

Для валидации метода А с изократическим элюированием были приготовлены градуировочные растворы в диапазоне от 0,2 до 25 мкг/см^3 путем разбавления сертифицированного градуировочного раствора (см. 4.8.1) ацетонитрилом/водой в соотношении 10 : 90 по объему (см. 4.4).

Для валидации метода В с градиентным элюированием были приготовлены градуировочные растворы в диапазоне от 0,5 до 10 мкг/см^3 путем разбавления стандартного раствора (см. 4.9.3) раствором метанол/вода (см. 4.3).

Растворы, если их не используют, следует хранить в темном и охлажденном месте (около 4 °С). Растворы нельзя хранить более 3 мес и замораживать. Перед использованием растворы выдерживают при комнатной температуре.

4.10 Эталонный материал[1)]

Эталонный материал мяса мидий следует хранить в соответствии с инструкциями производителя. Каждую бутылку перед открытием следует прогреть до комнатной температуры, а содержимое тщательно перемешать при помощи вихревой мешалки в течение не менее 2 мин. После вскрытия бутылки следует немедленно использовать все содержимое. Эталонный материал может быть использован для проверки точности указанного аналитического метода. Эталонный материал следует экстрагировать методом, описанным в 6.2.1 или 6.2.2.

5 Оборудование

Используют стандартное лабораторное оборудование, в том числе перечисленное ниже.

5.1 **Весы лабораторные** с точностью взвешивания 0,1 мг.

5.2 **Весы лабораторные** с точностью взвешивания 0,01 г.

5.3 **Гомогенизатор** (например, измельчитель или блендер).

5.4 **Механическая мешалка** с диапазоном скорости от 8 000 до 45 000 об/мин (например, диспергатор Ultra-Turrax).

5.5 **Центрифуга**, пригодная для эффективного разделения жидкой и твердой фаз, например обеспечивающая фактор разделения 3 000 g[2)] (желательно с охлаждением до 4 °С).

5.6 **Центрифужные пробирки** вместимостью от 30 до 50 см^3, с завинчивающимися крышками.

5.7 **Мембранные фильтры**, совместимые с метанолом, с размером пор 0,2 или 0,45 мкм, например из ацетата целлюлозы без поверхностно-активных веществ с предфильтром из стекловолокна.

5.8 **Регулируемые автоматические пипетки**, подходящие для диапазона от 20 до 1 000 мм^3.

5.9 **Электрический нагреватель** (метод В).

5.10 **Флаконы для ВЭЖХ.**

[1)] Подходящие эталонные материалы имеются, например, в Институте морских биологических наук Национального исследовательского совета Канады, Галифакс, Новая Шотландия — Канада. Эпидомоевая кислота содержится в таком сертифицированном эталонном материале в малых количествах. Данная информация приведена исключительно для информационных целей и не является рекламой CEN указанной продукции. Допускается использовать аналогичную продукцию при условии обеспечения идентичных результатов.

[2)] $g = 9{,}81\ \text{м} \cdot \text{с}^{-2}$.

5.11 **Флаконы из темного стекла** вместимостью 2 $см^3$ или меньше, например с обжимными крышками (для хранения градуировочных растворов домоевой кислоты).

5.12 **Установка ВЭЖХ**, в которую входят:

5.12.1 **Система ввода.**

Примечание — Охлаждение инжектора может предотвратить распад домоевой кислоты, особенно при высокой комнатной температуре.

5.12.2 **Насос**, пригодный для изократического элюирования (метод А) или градиентного элюирования (метод В).

5.12.3 **Колоночный термостат**, поддерживающий температуру (40 ± 2) °С (метод А) или (35 ± 2) °С (метод В).

5.12.4 **Разделительная колонка**, обращенно-фазовая колонка С18, например, длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм (для метода А) или 4,0 мм (для метода В), заполненная частицами размером 5 мкм.

Примечание — Допускается использовать колонки для жидкостной хроматографии других размеров, если отрегулирован расход подвижной фазы и/или объем ввода. Рекомендуется использовать предколонку. Соответствующие результаты также могут быть достигнуты при следующих условиях: колонка С18 длиной 250 мм и внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная сопоставимой стационарной фазой с объемом вводимой пробы 5 $мм^3$ и скоростью потока от 0,2 до 0,3 $см^3$/мин.

5.12.5 **УФ-детектор**, по возможности диодно-матричный, настроенный на 242 нм, обеспечивающий отношение сигнал/шум (S/N) 10 : 1 при введении 0,2 мкг/$см^3$ раствора домоевой кислоты с соблюдением условий согласно 6.3.

6 Методика проведения испытания

6.1 Подготовка проб

6.1.1 Непереработанные двустворчатые моллюски в раковинах

Моллюски снаружи тщательно промывают водопроводной водой. Моллюски открывают, отрезав приводящую мышцу. Внутреннюю часть моллюсков промывают водопроводной водой для удаления песка и посторонних частиц. Удаляют мясо моллюсков из раковин. Нельзя применять для открытия раковин тепло или анестетики. Мясо моллюсков помещают в сито на 5 мин, чтобы дать воде стечь. Полученное мясо моллюсков объединяют и в количестве не менее 100—150 г гомогенизируют (см. 5.3) [4]. Навески отбирают сразу после гомогенизации или после повторного перемешивания. При подготовке проб гребешка согласно [5] следует использовать не менее 10 экземпляров моллюска.

6.1.2 Непереработанные двустворчатые моллюски без раковин (целые или отдельные части, пригодные для употребления в пищу)

При необходимости мясо моллюсков промывают водопроводной водой и дают воде стечь. Полученное мясо моллюсков объединяют и в количестве не менее 100—150 г гомогенизируют (см. 5.3). Навески отбирают сразу после гомогенизации или повторного перемешивания. При подготовке проб гребешка согласно [5] следует использовать не менее 10 экземпляров моллюска или отдельные части, пригодные для употребления в пищу (мышцу, мышцу и гонаду).

6.1.3 Непереработанная рыба

Рыбу промывают, удаляют чешую и разделывают. В случае мелких рыб в целом виде длиной 15 см и менее используют от 5 до 10 рыб. В случае рыб среднего размера удаляют и выбрасывают головы, чешую, хвостовые и другие плавники, внутренности и кости. Рыба должна быть разделана таким образом, чтобы мясо и кожа рыбы сохранили целостность от головы до хвостовой части и от спины до брюшка с обеих сторон [4]. Подготовленную рыбу объединяют и в количестве не менее 100—150 г гомогенизируют (см. 5.3). Навески отбирают сразу после гомогенизации или повторного перемешивания.

6.1.4 Готовые к употреблению мидии[1)]

Мясо мидий, готовое к употреблению, объединяют и в количестве не менее 100—150 г гомогенизируют (см. 5.3). Навески отбирают сразу после гомогенизации или повторного перемешивания. Если в

[1)] Практика применения метода в лаборатории показала, что другие готовые к употреблению двустворчатые моллюски, например гребешки, также могут быть подготовлены в соответствии с 6.1.4, однако данная возможность не была подтверждена в ходе межлабораторного испытания. Для исследования гребешков следует брать не менее 10 особей [5].

лабораторию мидии поступают в непереработанном виде, но для испытаний желательно использовать метод В, тогда мидии следует сначала термически обработать, а затем открыть и удалить раковины.

6.2 Процедура экстракции

Примечание — Перед экстракцией необходимо убедиться, не изменились ли условия ее проведения в лаборатории.

6.2.1 Метод А

Взвешивают точную навеску (4,0 ± 0,1) г гомогенизированного продукта в центрифужной пробирке (см. 5.6) или чаше блендера из нержавеющей стали. Добавляют 16 см^3 смеси метанол/вода (см. 4.3) и тщательно перемешивают пробу в блендере или центрифужной пробирке (3 мин при 10 000 об/мин) при помощи мешалки (см. 5.4). После извлечения содержимого из блендера или центрифужной пробирки тщательно их промывают, чтобы предотвратить загрязнение следующей пробы.

Если для гомогенизации был использован блендер, полученную смесь переносят в центрифужную пробирку.

6.2.2 Метод В

Взвешивают (5,0 ± 0,1) г гомогенизированного продукта в центрифужной пробирке (см. 5.6). Добавляют 15 см^3 смеси метанол/вода (см. 4.3) и перемешивают около 2 мин при помощи мешалки (см. 5.4).

В результате нагревания экстракта можно улучшить декантирование надосадочной жидкости. В этом случае пробирку закрывают и нагревают смесь при температуре от 60 °С до 70 °С в течение 15 мин [3]. Пробу оставляют остывать до комнатной температуры. Следует обратить внимание, что нагревание экстракта может привести к незначительному распаду домоевой кислоты.

6.2.3 Центрифугирование, разбавление и хранение

Экстракт центрифугируют в течение 10 мин при 3 000 *g* или выше. Часть надосадочной жидкости фильтруют через сухой фильтр, подходящий для экстрактов, содержащих метанол, с размером пор 0,45 или 0,2 мкм. Полученные пробы экстрактов необходимо сразу анализировать. Если анализ не проводится сразу, то экстракт можно хранить в холодильнике при температуре около 4 °С в плотно закрытых завинчивающимися крышками контейнерах для хранения.

Экстракция холостой пробы: проводят процедуру экстракции (см. 6.2.1 или 6.2.2), заменяя содержимое пробы водой (хроматограммы не должны показывать никаких пиков элюирования вблизи домоевой кислоты или вызывать чрезмерный подъем базовой линии).

Для скрининга проб с установленным или предположительно высоким уровнем загрязнения домоевой кислотой экстракт можно разбавлять смесью метанол/вода (см. 4.3).

6.3 Определение методом ВЭЖХ

6.3.1 Общие положения

При валидации метода с соблюдением условий, установленных в 6.3.2, пробы, экстрагированные согласно 6.2.1, определяют методом ВЭЖХ в изократическом режиме, а пробы, экстрагированные согласно 6.2.2, — методом ВЭЖХ в режиме градиентного элюирования. Однако практика применения метода в лаборатории показала, что условия ВЭЖХ, указанные для методов А и В, могут быть использованы для обоих видов экстрагирования. Типичная хроматограмма представлена в приложении В.

6.3.2 Условия ВЭЖХ

Содержание домоевой кислоты в пробе определяют после хроматографического разделения на обращенно-фазовой колонке в изократическом режиме с элюентом 1 (см. 4.7.1) либо в режиме градиентного элюирования с элюентом 2 (см. 4.7.2) и элюентом 3 (см. 4.7.3).

Определение методом ВЭЖХ при следующих условиях показывает удовлетворительные результаты:

Колонка:	С18, обратная фаза, 5 мкм, 250 × 4,6 мм или 4,0 мм.
Температура:	40 °С или 35 °С.
Скорость потока:	1 или 0,7 см^3/мин.
Вводимый объем:	от 5 до 20 мм^3.
УФ-детектор:	242 нм.
Время работы в изократическом режиме:	от 15 до 20 мин.

Примечание — Указанные условия были применены при межлабораторных испытаниях с использованием метода А в изократическом режиме. Выделенные курсивом условия были применены при межлабораторных испытаниях с использованием метода В в режиме градиентного элюирования.

При использовании другого варианта разделительной колонки может потребоваться уточнение хроматографических условий. Подходящие условия градиента описаны в таблице 1.

Таблица 1 — Программа градиентного элюирования

Время, мин	Элюент 2, %	Элюент 3, %
0,00	90	10
30,00	90	10
30,10	60	40
40,00	60	40
40,10	90	10
50,00	Конец	

6.4 Градуировочный график

Градуировочный график минимум с четырьмя точками строят каждый день при проведении анализа и/или при изменении хроматографических условий. Строят график зависимости площади пика от концентрации введенных градуировочных растворов домоевой и эпидомоевой кислот. Необходимо убедиться, что коэффициент корреляции градуировочной кривой показывает линейную регрессию (метод А: $r \geq 0,99$ и тест на отклонение значений градуировочных точек (расчет процентного соотношения между каждой точкой калибровки площади пика Y_i и соответствующей точкой калибровки массы X_i относительно средних значений всех соотношений) Y_i/X_i [%] находится в диапазоне (100 ± 10) %).

6.5 Введение пробы

Пробы вводят в двух повторностях, если повторяемость вводимых проб не является достаточной. Коэффициент вариации (CV) для двух последовательных вводов не должен превышать 5 %. Для проверки стабильности системы периодически вводят градуировочные растворы и/или растворы с фиксированными концентрациями эталонного материала (см. 4.10).

7 Обработка результатов

7.1 Идентификация

Идентификацию домоевой и эпидомоевой кислот проводят путем сравнения времени удерживания пробы со временем удерживания стандартных веществ.

Было установлено, что чистая домоевая кислота в растворе постепенно изомеризуется, особенно в диастереомере С5'-эпидомоевой кислоты, поэтому длительное хранение стандартов неизбежно приведет к образованию смеси. Поскольку эпидомоевая кислота имеет УФ-спектр, идентичный спектру домоевой кислоты, относительные молярные коэффициенты отклика в жидкостной хроматографии с УФ-детектированием идентичны и относительные соотношения могут быть пересчитаны в любое время. При определенных условиях жидкостной хроматографии домоевая и эпидомоевая кислоты не могут быть разделены. Это не является проблемой и упрощает анализ. Сумму двух площадей домоевой и эпидомоевой кислот следует использовать для калибровки измерительных приборов и количественного определения домоевой кислоты в пробах [3].

7.2 Количественное определение

Количественное определение домоевой и эпидомоевой кислот в пробе проводят методом внешнего стандарта путем интегрирования площади пика относительно градуировочного графика стандартов домоевой кислоты (см. 4.10). Массовую долю домоевой и эпидомоевой кислот в пробе w, мг/кг, рассчитывают по формуле

$$w = \frac{\text{площадь пика} - b}{a} \cdot \frac{D}{m} \cdot V_t, \quad (1)$$

где a — наклон линии градуировочного графика;

b — отрезок у оси координат градуировочного графика;

D — коэффициент разбавления (если экстракт был разбавлен);

m — масса пробы в граммах, как правило, 4 г (метод А) или 5 г (метод В);

V_t — общий объем гомогенного продукта и растворителя для экстракции, см^3.

8 Прецизионность

Метод А с использованием изократического режима был подтвержден в межлабораторных испытаниях с участием 13 лабораторий. Подробные результаты межлабораторных испытаний в отношении точности метода приведены в таблице А.1 (приложение А).

Метод В с использованием режима градиентного элюирования был подтвержден в межлабораторных испытаниях с участием 11 лабораторий. Подробные результаты межлабораторных испытаний точности метода приведены в таблице А.2 (приложение А).

В таблице А.3 (приложение А) приведены результаты испытаний по оценке прецизионности методов из программ проверки квалификации.

Значения, полученные при межлабораторных испытаниях, могут быть неприменимы к другим диапазонам концентраций и матрицам, отличным от приведенных в приложении А.

9 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать:

- всю информацию, необходимую для идентификации пробы (тип пробы, происхождение пробы, название);
- ссылку на настоящий стандарт;
- дату и метод отбора проб (если известно);
- дату получения пробы;
- дату проведения испытания;
- результаты измерения и единицы, в которых они были выражены;
- все особенности, наблюдавшиеся при проведении испытания;
- любые детали, не указанные в настоящем стандарте или рассматриваемые как необязательные, а также все особенности, которые могли повлиять на результаты испытания.

Приложение А
(справочное)

Данные по прецизионности методов

А.1 Данные по прецизионности метода А с использованием изократического элюирования

Результаты, приведенные в таблице А.1, были получены в ходе исследования «Валидационное исследование ЕС по определению домоевой кислоты посредством метода ВЭЖХ-УФ», организованного Референтной лабораторией ЕС по морским биотоксинам (EURLMB) в соответствии с [6], с использованием различных матриц и уровней загрязнения на холостых пробах для параллельных определений.

Таблица А.1 — Данные по прецизионности метода А с использованием изократического элюирования

Проба	Венериды, искусственно загрязненные	Венериды, ез[a)]	Мидии, искусственно загрязненные	Гонады морского гребешка, ез[a)]	Морской гребешок целый, ез[a)]	Анчоусы, ез[a)]
Год проведения испытания	2003	2003	2003	2003	2003	2003
Количество лабораторий	12	12	12	13	13	12
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбракованных	12	12	11	13	13	11
Количество выбракованных (лабораторий)	0	0	1	0	0	1
Количество принятых результатов	12	12	11	13	13	11
Среднее значение $\bar{x}$, мг/кг	3,38	17,7	11,6	2,72	9,63	85,1
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/кг	0,28	0,40	0,37	0,12	0,18	1,1
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	8,3	2,3	3,2	4,4	1,9	1,3
Предел повторяемости r [$r = 2{,}8 \cdot s_r$], мг/кг	0,78	1,12	1,04	0,34	0,50	3,08
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/кг	0,51	1,6	2,0	0,62	1,2	6,6
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	15	9,0	17	23	12	7,8
Предел воспроизводимости R [$R = 2{,}8 \cdot s_R$], мг/кг	1,43	4,48	5,60	1,74	3,36	18,5
Значение индекса Горвица (HorRat)	1,1	0,87	1,6	1,7	1,0	0,94
Степень обнаружения, %	79		84			

[a)] ез — естественное загрязнение.

А.2 Данные по прецизионности метода В с использованием градиентного элюирования

Данные, приведенные в таблице А.2, были получены в межлабораторных испытаниях [7] в соответствии с руководящими принципами Закона Германии о пищевых продуктах и кормах (§ 64-LFGB), которые были проведены немецкой рабочей группой (§ 64-LFGB) «Токсины моллюсков» с использованием двух матриц искусственно загрязненных мидий и одной матрицы незагрязненных мидий. Холостая проба была идентифицирована всеми участниками. В данном исследовании был применен описанный метод. Нагревали экстракт и применяли режим градиентного элюирования ВЭЖХ. Каждый участник проводил испытания пяти проб, и если результаты теста Граббса были неудовлетворительными, то анализировали еще три дополнительные пробы.

Таблица А.2 — Данные по прецизионности метода В с использованием градиентного элюирования

Проба	Мясо мидии А	Мясо мидии В
Год проведения испытания	2001	2001
Количество лабораторий	11	11
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбракованных	10	10
Количество выбракованных (лабораторий)	1	1
Количество принятых результатов	10	10
Среднее значение $\bar{x}$, мг/кг	12,9	5,0
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мг/кг	0,5	0,2
Предел повторяемости r [$r = 2{,}8 \cdot s_r$], мг/кг	1,4	0,5
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/кг	1,4	0,6
Предел воспроизводимости R [$R = 2{,}8 \cdot s_R$], мг/кг	3,9	1,7
Значение индекса Горвица (HorRat)	1,0	0,96
Степень обнаружения, %	85—92[a)]	81—90[a)]
Степень обнаружения, %; уровень высеваемости, определенный участниками	86	83
[a)] Полученные в исследованиях однородности и стабильности перед основной частью межлабораторного исследования.		

А.3 Данные по прецизионности методов из программ проверки квалификации EURLMB

В таблице А.3 приведены данные из программ проверки квалификации при проведении испытаний по определению домоевой кислоты, организованных Референтной лабораторией ЕС по морским биотоксинам в период с 2011 по 2013 год. В таблице А.3 приведены только значения, полученные от лабораторий, которые использовали методы ВЭЖХ-УФ.

Таблица А.3 — Данные по прецизионности методов из программ проверки квалификации EURLMB при использовании метода ВЭЖХ-УФ

Проба	1	2	3	4	5	6
Матрица	Морские гребешки, ез[a)]	Мидии, ез[a)]	Морские гребешки, ез[a)]	Венериды, ез[a)]	Мидии, ез[a)]	Морские гребешки без гепатопанкреаса, ез[a)]
Год проведения испытания	2011	2011	2012	2012	2013	2013
Количество переданных данных	24	24	26	26	25	25
Присвоенное значение[b)], мг/кг	15,8	4,7	35,7	22,4	30,5	8,8

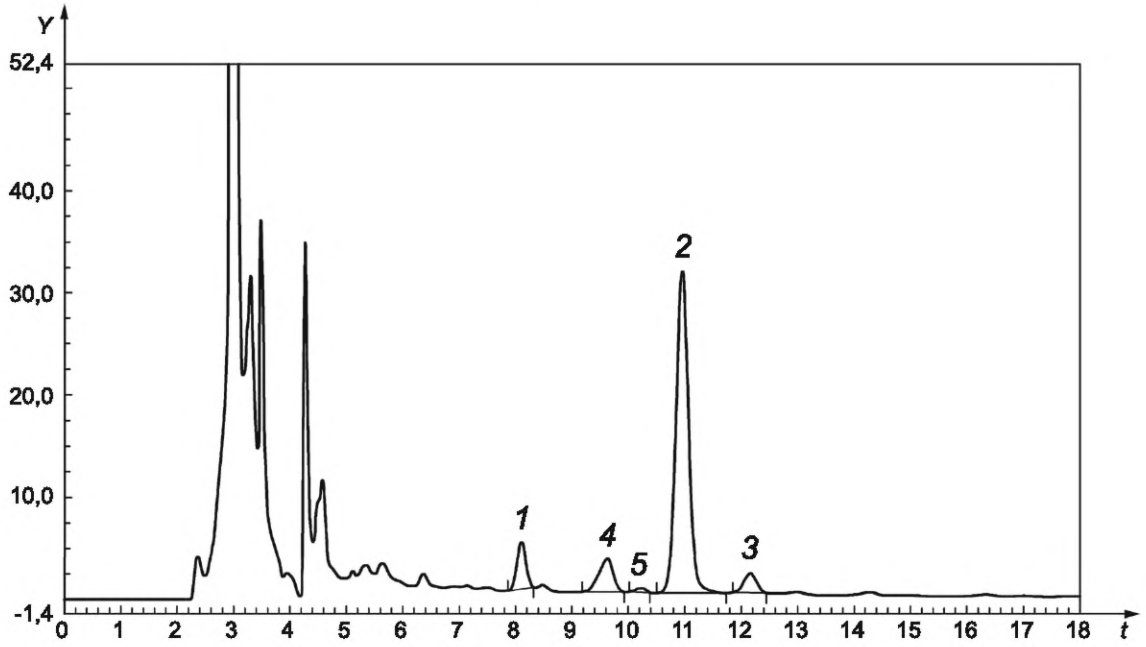
Окончание таблицы А.3

Проба	1	2	3	4	5	6
Матрица	Морские гребешки, ез[a)]	Мидии, ез[a)]	Морские гребешки, ез[a)]	Венериды, ез[a)]	Мидии, ез[a)]	Морские гребешки без гепатопанкреаса, ез[a)]
Неопределенность присвоенного значения, мг/кг	0,2	0,1	0,6	0,6	0,5	0,3
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мг/кг	1,2	0,6	3,3	2,3	2,6	1,1
Предел повторяемости r [$r = 2{,}8 \cdot s_r$], мг/кг	3,4	1,7	9,2	6,4	7,3	3,1
Значение индекса Горвица (HorRat)	0,7	0,9	1,0	1,0	0,9	1,1

[a)] ез — естественное загрязнение.
[b)] Вычислено с помощью робастных методов статистического анализа: алгоритм А (ISO 13528:2015).

Приложение В
(справочное)

Типовая хроматограмма



Хроматография с использованием ВЭЖХ Dionex с PDA100, Nucleosil C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм) в изократическом режиме элюирования.

Y — относительная интенсивность, %;
t — время, мин; *1* — L-триптофан; *2* — домоевая кислота; *3* — эпидомоевая кислота; *4* — изодомоевая кислота D; *5* — изодомоевая кислота E

Рисунок В.1 — Типовая хроматограмма эталонного материала MUS1b

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочного европейского стандарта межгосударственному стандарту

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного европейского стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
EN ISO 3696	—	*,[1)]
* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык данного европейского стандарта.		

[1)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 52501—2005 (ИСО 3696:1987) «Вода для лабораторного анализа. Технические условия».

Библиография

[1] Quilliam M.A. Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin In: Hallegraeff G.M., Anderson D.M. and Cembella A.D. (Eds.). Manual on Harmful Marine Microalgae, Monographs on Oceanographic Methodology, Vol. 11, Chapter 9. Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO), Paris, pp. 247—266 (2003) [Химические методы исследования домоевой кислоты, амнестического токсина моллюсков (ASP)]

[2] Quilliam M.A., Xie M., Hardstaff W.R. Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. J.AOAC Int. 1995, 78 (2), pp. 543—554 (Быстрая экстракция и очистка для определения домоевой кислоты в несоленых морепродуктах методом жидкостной хроматографии)

[3] Quilliam M.A., Sim P.G., McCulloch A.W., McInness A.G. High performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton. Int. J.Environ. Anal. Chem. 1989, 36, pp. 139—154 (Определение домоевой кислоты, морского нейротоксина в моллюсках и планктоне методом высокоэффективной жидкостной хроматографии)

[4] Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th ED, sec 959.08 and 937.07. AOAC, Arlington, Vol. II,1990 (Официальные методы анализа Ассоциации официальных химиков-аналитиков)

[5] Commission Decision of 15 March 2002 establishing special health checks for the harvesting of certain bivalve molluscs with a level of amnesic shellfish poison (ASP) exceeding the limit laid down by Council Directive 91/492/EEC (2002/226/EC).O.J.E.C. L75 of 16.3.2002, 65—66 (Решение Комиссии от 15 марта 2002 г., устанавливающее специальный санитарный контроль некоторых видов собранных и обработанных двустворчатых моллюсков с уровнем токсина (ASP), превышающим пределы, установленные в Директиве Совета 91/492/EEC)

[6] Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. Pure Appl. Chem. 60, 855, 864 (1988); revised version: W. Horwitz. Pure Appl. Chem. 1995, 67, 331—343 (Протокол для разработки, проведения и интерпретации метода исследования)

[7] L 12.03/04-3 Untersuchung von Lebensmitteln — Bestimmung von Domoins*ä*ure — ASP-Toxin in Muscheltieren und Muscheltiererzeugnissen mittels RP-HPLC (Food analysis — Determination of domoic acid — ASP-toxin in shellfish and shellfish products with RP-HPLC) Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64-LFBG, Beuth Verlag GmbH Berlin, Dec. 2002 (Анализ пищевых продуктов. Определение домоевой кислоты. Амнестический токсин моллюсков (ASP) в двустворчатых моллюсках и продуктах из моллюсков по методу ОФ ВЭЖХ)

[8] EN ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий)

[9] ISO 13528:2015 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison (Методы статистические, применяемые при проверке технической компетентности лабораторий посредством межлабораторных сличений)

УДК 664:543.544.5.068.7:006.354 МКС 67.120.30 IDT

Ключевые слова: пищевая рыбная продукция, двустворчатые моллюски, мидии, рыба, домоевая кислота, эпидомоевая кислота, высокоэффективная жидкостная хроматография, УФ-детектирование

Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 25.11.2025. Подписано в печать 19.12.2025. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,12.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

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

gost.e-ecolog.ru