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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
34618—
2019**

Продукция пищевая специализированная на зерновой основе

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИНОВ Т-2 И НТ-2 МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС С ИММУНОАФФИННОЙ ОЧИСТКОЙ НА КОЛОНКАХ

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

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 Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи» (ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 036 «Продукция специализированная пищевая»

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 28 ноября 2019 г. № 124-П)

За принятие проголосовали:

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

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2019 г. № 1316-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34618—2019 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июня 2020 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

© Стандартинформ, оформление, 2019

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 Сущность метода 3
5 Требования к выполнению измерений 3
6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы 3
7 Отбор и подготовка проб 4
8 Подготовка к проведению измерений 4
9 Условия проведения измерений 7
10 Выполнение измерений 10
11 Обработка результатов измерения 11
12 Метрологические характеристики и контроль точности 11
13 Оформление результатов 12

МКС 71.040.50

Поправка к ГОСТ 34618—2019 Продукция пищевая специализированная на зерновой основе. Определение токсинов Т-2 и НТ-2 методом ВЭЖХ-МС с иммуноаффинной очисткой на колонках

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 8 2020 г.)

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 пищевая специализированная на зерновой основе

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИНОВ Т-2 И НТ-2 МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС С ИММУНОАФФИННОЙ ОЧИСТКОЙ НА КОЛОНКАХ

Cereal-based foods for special dietary uses. High performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for determination of mycotoxins T-2 and HT-2 after immunoaffinity sample clean-up

Дата введения — 2020—06—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает порядок применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) с предварительной очисткой на иммуноаффинных колонках для определения массовой доли токсинов Т-2 и НТ-2 в зерне и зернопродуктах, в том числе в специализированной продукции для питания детей, беременных и кормящих женщин, в диапазоне от 0,0015 до 0,15 мг/кг и от 0,0075 до 0,15 мг/кг соответственно.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

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 12.4.021 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

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

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

ГОСТ ISO 3696* Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля

ГОСТ 4198 Реактивы. Калий фосфорно-кислый однозамещенный. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4234 Реактивы. Калий хлористый. Технические условия

ГОСТ ИСО 5725-1** Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 52501—2005 «Вода для лабораторного анализа. Технические условия».

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002.

Издание официальное

ГОСТ ИСО 5725-2* Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

ГОСТ ИСО 5725-3** Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 3. Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений

ГОСТ ИСО 5725-4*** Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерений

ГОСТ ИСО 5725-5*4 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 5. Альтернативные методы определения прецизионности стандартного метода измерений

ГОСТ ИСО 5725-6—2003*5 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 6995 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

ГОСТ ISO 7886-1 Шприцы инъекционные однократного применения стерильные. Часть 1. Шприцы для ручного использования

ГОСТ 8756.0 Продукты пищевые консервированные. Отбор проб и подготовка их к испытанию

ГОСТ 11773 Реактивы. Натрий фосфорно-кислый двузамещенный. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13867 Продукты химические. Обозначение чистоты

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

ГОСТ 26678 Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия

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

ГОСТ 33303 Продукты пищевые. Методы отбора проб для определения микотоксинов

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 указателям 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 следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **надосадочная жидкость:** Жидкость, располагающаяся над твердым слоем (осадком, седиментом) после центрифугирования пробы.

3.2 **подвижная фаза:** Поток жидкости (растворитель или смесь растворителей), проходящий через неподвижную фазу и переносящий вещество.

3.3 **аналит:** Вещество, определяемое в пробе объекта аналитического контроля.

3.4 **токсин Т-2 [8-(3-метилбутирилокси)-4,15-диацетокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен-3-ол]:** Наиболее токсичный представитель группы трихотеценовых микотоксинов группы А, токсическое действие которого характеризуется поражением кроветворных и иммунокомпетентных органов, развитием геморрагического синдрома, лейкопенией, анемией, нарушением функций желудочно-кишечного тракта.

3.5 **токсин НТ-2 [8-(3-метилбутирилокси)-15-ацетокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен-3,4-диол]:** Гидролизованный метаболит токсина Т-2, обладающий сходными с последним токсическими свойствами.

3.6 **элюат:** Раствор, содержащий аналиты и выходящий из иммуноаффинной колонки после промывки.

---

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-2—2002.

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-3—2002.

*** В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-4—2002.

*4 В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-5—2002.

*5 В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002.

4 Сущность метода

Метод основан на использовании для определения токсинов Т-2 и НТ-2 ВЭЖХ-МС/МС в режиме электрораспылительной ионизации. Подготовка пробы включает в себя экстракцию метанольным раствором с последующим выделением аналитов на иммуноаффинных колонках. Идентификацию аналитов осуществляют по совпадению времен удерживания, регистрации характерных ионов-продуктов и их соотношений в МС-режиме. Количественное определение проводят методом внешней абсолютной градуировки.

5 Требования к выполнению измерений

5.1 Требования безопасности

5.1.1 При подготовке и проведении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

5.1.2 Помещение, в котором проводят измерения, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией в соответствии с ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005. Работу необходимо проводить, соблюдая правила личной гигиены и противопожарной безопасности согласно требованиям ГОСТ 12.1.004, и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

5.1.3 При работе с электроприборами необходимо соблюдать требования безопасности по ГОСТ 12.1.019.

5.1.4 При работе с химическими реактивами необходимо соблюдать требования безопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.007.

5.2 Требования к работе оператора

Выполнение измерений может проводить специалист, имеющий высшее образование в соответствии с профильным направлением подготовки, освоивший метод ВЭЖХ.

6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы

6.1 Средства измерений

Хроматограф жидкостный, оснащенный насосом высокого (ВЭЖХ) или ультравысокого (УВЭЖХ) давления, инжектором для ручного или автоматического ввода проб, термостатом колонок, тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором и программным обеспечением для сбора и обработки хроматографических данных.

Колонка хроматографическая*, заполненная объемно-пористым силикагелем с привитыми группами октадецилсилана (ОДС, С18) с размером частиц от 3,5 до 5 мкм, размер колонки 4,6—3×100—150 мм (ВЭЖХ) или с размером частиц от 1,8 до 2 мкм размер колонки 2,1×50—100 мм (УВЭЖХ).

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания ±0,01 г.

Дозаторы пипеточные с диапазоном объема доз от 500 до 5000 мм^3, от 100 до 1000 мм^3, от 40 до 200 мм^3 по ГОСТ 28311.

Цилиндры стеклянные объемом 25, 100 и 500 см^3 по ГОСТ 1770.

6.2 Вспомогательное оборудование

Мельница лабораторная, обеспечивающая размол зерна и зернопродуктов до частиц с размером не более 0,5 мм.

Шейкер лабораторный (встряхиватель) для пробирок, обеспечивающий скорость встряхивания от 50 до 100 об/мин.

Шейкер лабораторный (встряхиватель) для колб, обеспечивающий скорость встряхивания от 50 до 100 об/мин.

Баня ультразвуковая лабораторная с регулятором времени.

---

* Например, колонка Agilent Zorbax SB-C18, размерами 150×4,6 мм, размер частиц — 3,5 мкм или колонка Titan C18, размерами 100×2,1 мм, размер частиц — 1,9 мкм. Информация приведена для удобства пользователей стандарта и не является рекламной поддержкой указанного изделия.

Центрифуга настольная со скоростью вращения не менее 4000 об/мин, снабженная адаптерами для пробирок вместимостью 225 $см^3$.

Система для твердофазной экстракции (вакуумная или аналогичная).

Установка для вакуумного фильтрования и дегазирования подвижной фазы, снабженная мембранным фильтром размером пор 0,2 мкм.

Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678.

Бутыль стеклянная для хранения реагентов с крышкой вместимостью 500 $см^3$.

Колбы плоскодонные конические объемом 50 (исп. 2), 250 (исп. 1), 500 (исп. 1) $см^3$ по ГОСТ 25336.

Колбы мерные вместимостью 100, 1000 $см^3$ тип 2 по ГОСТ 1770.

Пробирки полимерные центрифужные конические с завинчивающейся крышкой вместимостью 225 $см^3$.

Пробирки полимерные центрифужные типа «эппендорф» вместимостью 2 $см^3$.

Емкости для жидких проб (виалы) с завинчивающимися крышками вместимостью 2; 4 $см^3$.

Шприц однократного применения вместимостью 5 $см^3$ с разъемом типа Luer-Lock по ГОСТ ISO 7886-1.

Фильтр бумажный складчатый «синяя лента», вырезанный из фильтровальной лабораторной бумаги по ГОСТ 12026.

Наконечники полимерные одноразовые для дозаторов объемом от 500 до 5000, от 100 до 1000 и от 40 до 200 $мм^3$.

6.3 Реактивы и материалы

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Вода для лабораторного анализа по ГОСТ ISO 3696, не менее второй степени чистоты.

Метанол для градиентной жидкостной хроматографии с коэффициентом пропускания не менее 99,8 % (относительно дистиллированной воды).

Метанол по ГОСТ 6995, х. ч.

Таблетки фосфатно-солевого буфера из смеси солей: 1,15 г натрия фосфорно-кислого двузамещенного 12-водного, 0,2 г калия фосфорнокислого однозамещенного 2-водного, 0,2 г калия хлорида, 8,0 г натрия хлорида.

Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198, х. ч.

Натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 11773, ч. д. а.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.

Калий хлористый по ГОСТ 4234, х. ч.

Колонки иммуноаффинные для определения токсинов Т-2 и НТ-2 типа Easy-Extract T-2@HT-2* или аналог.

Токсин сухой Т-2 с чистотой ≥ 98 % (для ВЭЖХ, CAS:21259-20-1 массой 1 мг).

Токсин сухой НТ-2 с чистотой ≥ 98 % (для ВЭЖХ, CAS:26934-87-2 массой 1 мг).

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и вспомогательного оборудования с техническими характеристиками не хуже, а также материалов и реактивов по качеству не ниже указанных в настоящем стандарте.

Примечание — Квалификация чистоты реагента: «ч. д. а» — чистый для анализа, «х. ч» — химически чистый по ГОСТ 13867.

7 Отбор и подготовка проб

Отбор проб продовольственного сырья и пищевых продуктов проводят в соответствии с нормативным документом, регламентирующим отбор проб на конкретный вид продукции, в частности: пищевые продукты — по ГОСТ 33303, пищевые консервированные продукты — по ГОСТ 8756.0 или другим нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

8 Подготовка к проведению измерений

8.1 Приготовление стандартных растворов токсинов Т-2 и НТ-2

8.1.1 Приготовление стандартного раствора токсина Т-2

Для приготовления стандартного раствора токсина Т-2 с концентрацией 10 000 $нг/см^3$ сухой стандарт массой 1,0 мг количественно переносят в мерную колбу объемом 100 $см^3$ и доводят объем

* Допускается использовать аналогичные изделия, если может быть показано, что они приводят к таким же результатам.

до метки метанолом для градиентной жидкостной хроматографии. Раствор хранят в холодильнике при температуре минус (18 ± 2) °С не более 12 мес.

8.1.2 Приготовление стандартного раствора токсина НТ-2

Для приготовления стандартного раствора токсина НТ-2 с концентрацией 10 000 нг/см^3 сухой стандарт токсина массой 1,0 мг количественно переносят в мерную колбу объемом 100 см^3 и доводят объем до метки метанолом для градиентной жидкостной хроматографии. Растворы хранят в холодильнике при температуре минус (18 ± 2) °С не более 12 мес.

8.1.3 Приготовление стандартного раствора смеси токсинов Т-2 и НТ-2

Для приготовления стандартного раствора смеси токсинов с массовой концентрацией токсинов Т-2 и НТ-2 по 1000 нг/см^3 в виалу объемом 4 см^3 переносят 0,4 см^3 стандартного раствора токсина Т-2, 0,4 см^3 стандартного раствора токсина НТ-2 и добавляют 3,2 см^3 метанола, затем перемешивают. Раствор хранят в холодильнике при температуре минус (18 ± 2) °С не более 12 мес.

8.2 Приготовление градуировочных растворов смеси токсинов Т-2 и НТ-2

Для определения содержания токсинов Т-2 и НТ-2 готовят градуировочные растворы их смеси с массовой концентрацией: 100 нг/см^3 (раствор 8), 50 нг/см^3 (раствор 7), 25 нг/см^3 (раствор 6), 12,5 нг/см^3 (раствор 5), 6,25 нг/см^3 (раствор 4), 3,125 нг/см^3 (раствор 3), 1,56 нг/см^3 (раствор 2), 0,63 нг/см^3 (раствор 1). Для приготовления градуировочных растворов используют метанол для градиентной жидкостной хроматографии.

Для приготовления раствора 8 в виалу объемом 4 см^3 переносят 0,2 см^3 стандартного раствора смеси токсинов Т-2 и НТ-2 с массовой долей 1000 нг/см^3 (см. 8.1.3) и 1,8 см^3 метанола, затем перемешивают.

Для приготовления раствора 7 в виалу объемом 4 см^3 переносят 0,15 см^3 стандартного раствора смеси токсинов Т-2 и НТ-2 с массовой долей 1000 нг/см^3 (см. 8.1.3) и 2,85 см^3 метанола, затем перемешивают.

Для приготовления раствора 6 в виалу объемом 4 см^3 переносят 0,5 см^3 раствора 8 и 1,5 см^3 метанола, затем перемешивают.

Для приготовления раствора 5 в виалу объемом 4 см^3 переносят 0,5 см^3 раствора 7 и 1,5 см^3 метанола, затем перемешивают.

Для приготовления раствора 4 в виалу объемом 4 см^3 переносят 0,5 см^3 раствора 6 и 1,5 см^3 метанола, затем перемешивают.

Для приготовления раствора 3 в виалу объемом 4 см^3 переносят 0,5 см^3 раствора 5 и 1,5 см^3 метанола, затем перемешивают.

Для приготовления раствора 2 в виалу объемом 4 см^3 переносят 0,5 см^3 раствора 4 и 1,5 см^3 метанола, затем перемешивают.

Для приготовления раствора 1 в виалу объемом 4 см^3 переносят 0,6 см^3 раствора 2 и 0,9 см^3 метанола, затем перемешивают.

Растворы хранят в холодильнике при температуре минус (18 ± 2) °С не более 6 мес. Перед проведением измерений растворы доводят до комнатной температуры, перемешивают и переносят по 0,5—1 см^3 в виалы вместимостью 2 см^3.

8.3 Приготовление фосфатно-солевого буферного раствора, pH = 7,4 ед. pH

Фосфатно-солевой буфер может быть приготовлен двумя способами.

Способ 1. Навеску натрия фосфорно-кислого двузамещенного 12-водного массой 1,15 г, навеску калия фосфорно-кислого однозамещенного 2-водного массой 0,2 г, навеску калия хлорида массой 0,2 г и навеску натрия хлорида массой 8,0 г переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, добавляют от 10 до 20 см^3 дистиллированной воды. Перемешивают до полного растворения солей. Затем доводят объем раствора до метки и перемешивают еще раз.

Способ 2. Фосфатно-солевой буфер из таблетированной смеси готовят в соответствии с инструкцией производителя. В мерную колбу на 100 см^3 помещают одну таблетку смеси солей, добавляют дистиллированную воду, перемешивают до полного растворения таблетки, затем доводят до метки. Полученный раствор имеет pH = 7,4 ед. pH.

Раствор хранят в колбе с притертой пробкой в холодильнике при температуре (4 ± 1) °С не более 1 мес.

Вследствие хранения при низкой температуре возможно выпадение осадка солей. Для растворения осадка, как правило, достаточно довести раствор до комнатной температуры или незначительно подогреть на водяной бане.

Для подготовки пробы (см. 8.6) используют фосфатно-солевой буфер комнатной температуры.

8.4 Приготовление раствора для экстракции токсинов Т-2 и НТ-2

В плоскодонную коническую колбу или бутыль вместимостью 500 $см^3$ отмеряют цилиндром 350 $см^3$ метанола по ГОСТ 6995 и 150 $см^3$ дистиллированной воды. Раствор тщательно перемешивают.

Раствор хранят в герметично закрытой емкости при комнатной температуре не более 12 мес.

8.5 Приготовление подвижной фазы хроматографической системы

Хроматографическое разделение компонентов пробы проводят в режиме изократического или градиентного элюирования. Параметры элюирования оптимизируют для конкретной хроматографической колонки с целью достижения достаточного разделения компонентов пробы за приемлемое время анализа.

В качестве примера приведен состав подвижных фаз для изократического элюирования токсинов на колонке Agilent Zorbax SB-C18, размерами 150×4,6 мм, размер частиц — 3,5 мкм (см. 8.5.1) и градиентного элюирования на колонке Titan C18, размерами 100×2,1 мм, размер частиц — 1,9 мкм (см. 8.5.2).

Примечание — Для работы на колонке Titan необходим насос ультравысокого давления.

8.5.1 Для разделения компонентов проб в изократическом режиме элюирования используют подвижную фазу метанол — вода (80:20 об. %). Для приготовления подвижной фазы в плоскодонную коническую колбу или бутыль вместимостью 500 $см^3$ отмеряют цилиндром 400 $см^3$ метанола для градиентной жидкостной хроматографии и 100 $см^3$ воды для лабораторного анализа не менее второй степени чистоты. Раствор тщательно перемешивают и фильтруют с помощью установки для вакуумного фильтрования и дегазирования подвижной фазы.

Подвижную фазу хранят в герметично закрытой емкости не более 1 мес.

8.5.2 Градиентное элюирование осуществляют с помощью бинарного хроматографического насоса:

- фаза А: вода для лабораторного анализа не менее второй степени чистоты;
- фаза Б: метанол для градиентной жидкостной хроматографии.

Перед проведением измерений подвижные фазы фильтруют с помощью установки для вакуумного фильтрования и дегазирования подвижной фазы. При использовании градиентного элюирования обязательно наличие в хроматографической системе дегазирующего устройства. При отсутствии в хроматографической системе дегазирующего устройства в подвижную фазу А добавляют от 20 до 40 об. % метанола для градиентной жидкостной хроматографии и подбирают новую схему градиента.

Фаза А не хранится, перед каждой серией измерений готовят свежую фазу А. Фаза Б хранится в соответствии с указаниями производителя растворителя.

8.6 Подготовка проб

8.6.1 Отобранные пробы (по разделу 7) измельчают в течение нескольких минут в лабораторной мельнице до однородной консистенции, размер частиц не должен превышать 0,5 мм.

8.6.2 Взвешивают 20,0 г однородного и мелко измельченного образца в плоскодонной конической колбе вместимостью 250 $см^3$ или центрифужной пробирке вместимостью 225 $см^3$, добавляют 100 $см^3$ раствора для экстракции (по 8.4) и 2,0 г хлорида натрия, закрывают пробку/завинчивают крышку.

Экстракцию проводят в течение 30 мин: 10 мин на лабораторном шейкере (встряхивателе), 10 мин в ультразвуковой бане, 10 мин на лабораторном шейкере (встряхивателе). Скорость встряхивания подбирают таким образом, чтобы в колбе/пробирке не было зон с неподвижным осадком. Полученный экстракт фильтруют через бумажный складчатый фильтр «синяя лента» или центрифугируют в течение 15 мин при не менее чем 4000 об/мин.

8.6.3 В плоскодонную коническую колбу объемом 50 $см^3$ отбирают 7 $см^3$ фильтрата/надосадочной жидкости и добавляют 28 $см^3$ фосфатно-солевого буферного раствора (по 8.3), затем перемешивают. При необходимости полученный раствор фильтруют через бумажный складчатый фильтр «синяя лента» повторно.

8.6.4 Иммуноаффинную колонку устанавливают в систему для твердофазной очистки. Цилиндром отмеряют 25 $см^3$ полученного раствора (по 8.6.3) и наносят на иммуноаффинную колонку со скоростью потока не более 2 $см^3$/мин. Затем иммуноаффинную колонку промывают 20 $см^3$ дистиллированной воды со скоростью потока не более 5 $см^3$/мин и продувают воздухом из шприца с разъемом типа Luer-Lock до удаления остаточной жидкости.

Примечание — Условия хранения, сроки годности, подготовка колонок к работе — в соответствии с рекомендациями производителя.

8.6.5 В систему для твердофазной очистки устанавливают полимерные центрифужные пробирки типа «эппендорф» вместимостью 2 $см^3$ и элюируют токсины с иммуноаффинной колонки, добавляя 1,5 $см^3$ метанола для градиентной жидкостной хроматографии со скоростью одна капля в 1 с. Для обеспечения полноты извлечения аналитов во время элюирования рекомендуется проводить обратную промывку иммуноаффинной колонки, поднимая и опуская плунжер шприца с разъемом типа Luer-Lock для обеспечения потока метанола в противоположных направлениях. Процедуру обратной промывки повторяют три раза.

8.6.6 Элюат переносят в виалу вместимостью 2 $см^3$.

9 Условия проведения измерений

9.1 Условия проведения измерений методом ВЭЖХ/УВЭЖХ с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором (ВЭЖХ-МС/МС или УВЭЖХ-МС/МС) подбирают в зависимости от вида применяемого жидкостного хроматографа, тройного квадрупольного масс-спектрометрического детектора и хроматографической колонки.

9.2 Условия детектирования оптимизируют в ручном или автоматическом режиме. Для этого используют стандартный раствор смеси токсинов Т-2 и НТ-2 с массовой долей 1000 нг/$см^3$ (по 8.1.3).

В качестве примера приведены параметры масс-спектрометрического детектирования НТ-2 и Т-2 токсинов на примере тройных квадрупольных масс-спектрометрических детекторов Agilent Technologies 6410 TripQuad LC/MS и Thermo Scientific TSQ Endura*.

Для настройки масс-спектрометрического детектора устанавливают параметры, приведенные в таблице 1.

Таблица 1 — Параметры настройки детектора

Параметр	Agilent Technologies 6410 TripQuad LC/MS	Thermo Scientific TSQ Endura
Способ ионизации	Электрораспылительная ионизация при атмосферном давлении	
Полярность	Положительная	
Напряжение на капилляре, В	4000	4900
Параметры источника ионизации	Температура источника — 100 °С; температура газа осушителя (десольватации) (азот) — 350 °С; давление небулайзера — 0,4 МПа (60 *psi* или 4,14 бар)	Температура подогреваемого капилляра — 350 °С; температура испарителя — 400 °С; скорость потока оболочного газа — 35 ед.; скорость потока вспомогательного газа — 15 ед.; скорость потока сметающего газа — 25 ед.; давление газа для соударений — 0,2 Па (1,5 mTorr)
Режим детектирования	Мониторинг множественных реакций (*MRM*)	

Условия регистрации аналитических сигналов в режиме *MRM* представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Условия детектирования ионов в режиме *MRM*

Аналит		Материнский ион, $m/z(M + Na)^+$	Дочерний ион, m/z	Напряжение на фрагменторе, *В*	Энергия дисоциации (*CE*), В
Agilent Technologies 6410 TripQuad LC/MS					
Токсин Т-2	*Q*	489,2	245,1	190	24
	*q*1	489,2	327,1	190	20
	*q*2	489,2	387,1	190	16
Токсин НТ-2	*Q*	447,2	345,0	190	16
	*q*1	447,2	285,0	190	16

* Информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламной поддержкой указанного изделия. Допускается использовать аналогичные изделия, если может быть показано, что они приводят к таким же результатам.

Окончание таблицы 2

Аналит		Материнский ион, *m/z*(M + Na)$^+$	Дочерний ион, *m/z*	Напряжение на фрагменторе, *B*	Энергия дисоциации (*CE*), В
Thermo Scientific TSQ Endura					
Токсин Т-2	*Q*	489,14	244,95	138	23
	*q*1	489,14	326,89	138	23
	*q*2	489,14	387,37	138	21
Токсин НТ-2	*Q*	447,38	284,92	164	20
	*q*1	447,38	345,38	164	17
Примечание — *Q* — переход, используемый для количественного расчета; *q* — качественные переходы, используемые для подтверждения правильной идентификации токсинов.					

Сравнение интенсивностей переходов *MRM*, полученных для аналита в пробе и в стандарте, проводят визуально [например, в программном обеспечении Excalibur (Thermo Scientific)] или в автоматическом режиме [например, в программном обеспечении MassHunter, Agilent Technologies)], возможное отклонение — ±30 %. В качестве примера приведены отношения интенсивностей переходов для токсинов Т-2 и НТ-2, полученных в программном обеспечении MassHunter, Agilent Technologies (см. таблицу 3).

Таблица 3 — Отношения интенсивностей переходов для токсинов Т-2 и НТ-2, полученных в программном обеспечении MassHunter, Agilent Technologies

Аналит	Тип перехода	Переход, *m/z*	q_i/Q, %
Токсин Т-2	*Q*	489,2→245,1	—
	q1	489,2→327,1	50
	q2	489,2→387,1	45
Токсин НТ-2	*Q*	447,2→345,0	—
	q1	447,2→285,0	90

9.3 Условия хроматографических измерений

Хроматографическое разделение компонентов пробы проводят в режиме изократического или градиентного элюирования. Параметры элюирования оптимизируют для конкретной хроматографической колонки с целью достижения достаточного разделения компонентов пробы за приемлемое время анализа.

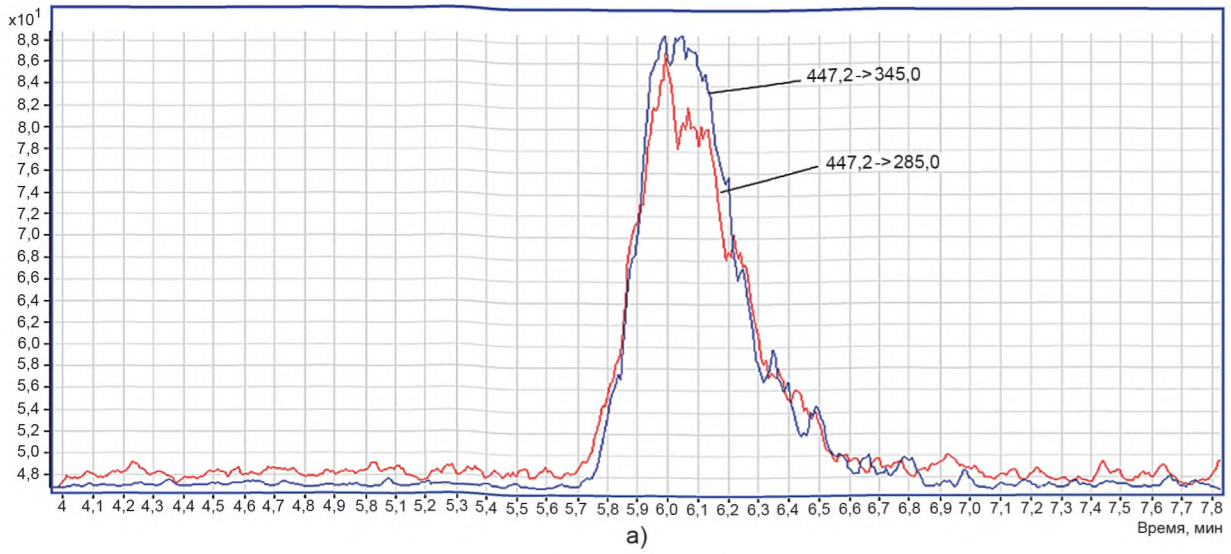
В качестве примера приведен состав подвижных фаз для изократического элюирования токсинов на аналитической ВЭЖХ колонке Agilent Zorbax SB-C18, размерами 150×4,6 мм, размер частиц — 3,5 мкм (ориентировочное давление в системе 80 атм.) и градиентного элюирования на УВЭЖХ колонке Titan C18, размерами100×2,1 мм, размер частиц — 1,9 мкм (ориентировочное максимальное давление в системе 750 атм.) (см. таблицу 4).

Таблица 4 — Параметры хроматографического определения

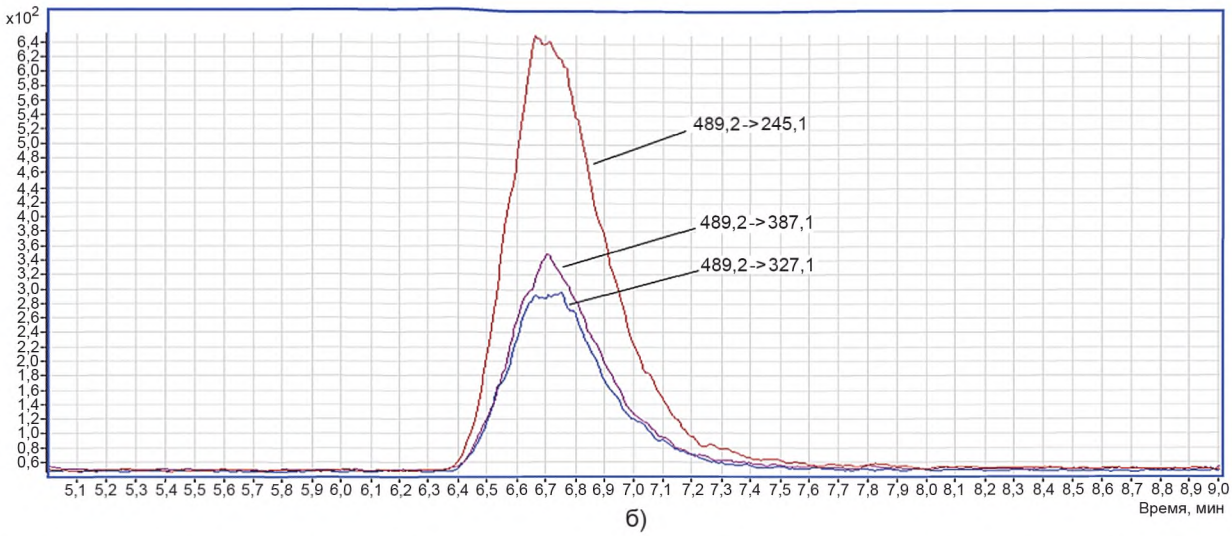
Параметр	ВЭЖХ	УВЭЖХ
Хроматографическая колонка	Zorbax SB-C18	Titan C18
Размер колонки	150×4,6 мм	100×2,1 мм
Диаметр частиц	3,5	1,9
Неподвижная фаза	Объемно-пористый силикагель с привитыми группами октадецилсилана (ODS, C18)	
Элюирование	Изократическое	Градиентное
Подвижная фаза	Метанол — вода (80:20 об. %)	Фаза А: вода Фаза Б: метанол Схема градиента: от 0 до 6 мин — линейное увеличение от 40 % до 80 % Б, от 6 до 8 мин — удерживание 80% Б, от 8 до 8,3 мин — линейное уменьшение Б от 80 % до 40 %, от 8,3 до 10 мин — уравновешивание системы

Окончание таблицы 4

Параметр	ВЭЖХ	УВЭЖХ
Время анализа, мин	10	10
Скорость подачи элюента, $см^3$/мин	0,4	
Температура колонки, °С	30	
Объем пробы, $\times 10^{-3} см^3$ (мкл)	10	4
Время удерживания токсинов, мин	6,0 (НТ-2); 6,8 (Т-2)	4,1 (НТ-2); 4,9 (Т-2)
Пример хроматограммы	См. рисунок 1	См. рисунок 2



а)



б)

Рисунок 1 — Хроматограмма образца детского питания, искусственно загрязненного токсинами НТ-2 и Т-2 на уровне 50 мкг/кг [а) — токсин НТ-2, б) — токсин Т-2], полученного на системе Agilent Technologies

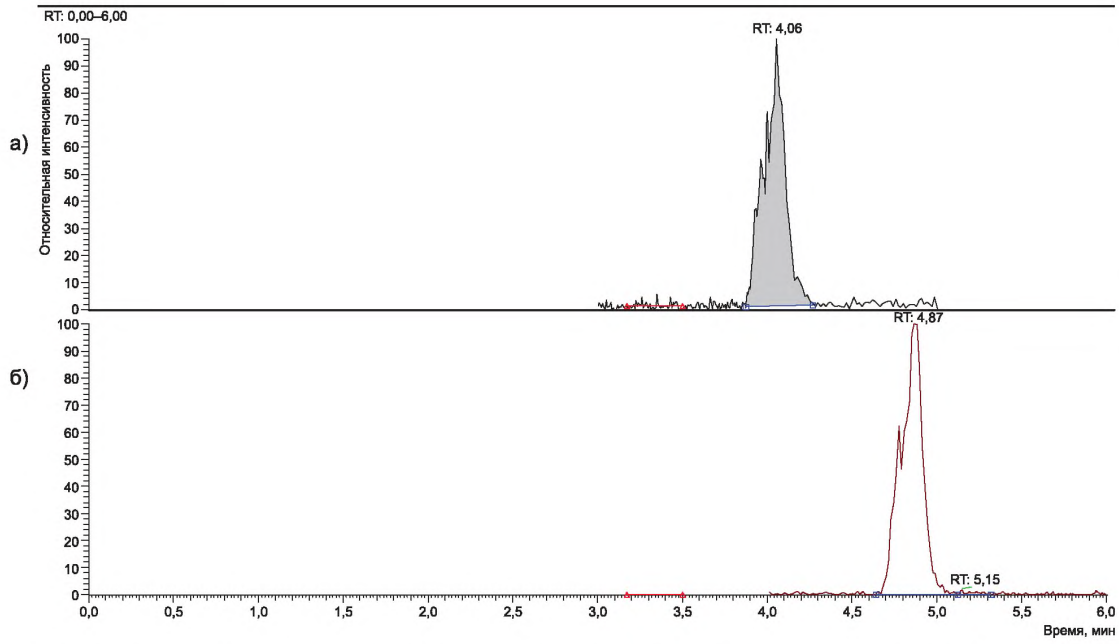


Рисунок 2 — Хроматограмма образца детского питания, искусственно загрязненного токсинами НТ-2 и Т-2 на уровне 50 мкг/кг [а) — токсин НТ-2, б) — токсин Т-2], полученного на системе Thermo Scientific

10 Выполнение измерений

10.1 Градуировка системы и измерение анализируемых проб

Перед проведением измерений хроматографическую систему кондиционируют подвижной фазой до установления стабильной базовой линии в условиях и порядке, рекомендуемых изготовителем. Для уравновешивания системы в качестве первого вкола последовательности рекомендуется использовать градуировочный раствор 8 (результаты не учитывают), а затем раствора для экстракции (см. 8.4).

Для получения восьми точек на градуировочной кривой необходимо получить хроматограммы всех восьми градуировочных растворов.

Проводят два параллельных измерения серии градуировочных образцов (в начале и в конце последовательности) и по два параллельных измерения анализируемых проб.

Образцы, дающие пики, большие, чем градуировочный раствор 8, разбавляют подвижной фазой (не более чем в 20 раз).

10.2 Построение градуировочных графиков

В соответствие с данными, полученными при измерении градуировочных растворов, создают калибровочную таблицу, содержащую наименование, время удерживания, концентрацию и площадь хроматографического пика для каждого токсина. Определение площади аналитов выполняют в автоматическом режиме системой обработки данных хроматографа. На основании калибровочной таблицы вручную или в автоматическом режиме строят градуировочный график зависимости аналитических сигналов (площади хроматографического пика, соответствующего количественному переходу «материнский — дочерний ион») двух параллельных измерений серии градуировочных образцов от содержания аналита в растворе.

Оценивают линейность и воспроизводимость результатов калибровки. При необходимости удаляют единичные выпадающие результаты. Коэффициент линейной корреляции полученной градуировочной зависимости должен быть не менее 0,97, а полученные результаты измерений не должны отличаться от действительного значения концентрации определяемых веществ в градуировочном растворе более чем на 15 %, относительное стандартное отклонение времени удерживания аналитов — не более чем на 5 %. При невыполнении этого условия выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их. В случае невыполнения указанного критерия стабильности градуировочной характеристики проводят новую градуировку.

Проведение градуировки обязательно выполнять при каждом измерении.

10.3 Контроль аналитической системы

Контроль стабильности результатов измерений (повторяемости, промежуточной прецизионности и погрешности) проводят в соответствии с порядком, установленным в лаборатории, по ГОСТ ИСО 5725-6—2003 (подраздел 6.2).

Контроль аналитической системы осуществляют при условиях, указанных в 9.1 и 9.2, перед началом проведения измерений, а также при смене хроматографической колонки, чистке блоков аналитического прибора и т. д.

11 Обработка результатов измерения

Массовую долю токсина Т-2 (НТ-2), мг/кг, вычисляют по формуле

$$X = \frac{C_x \cdot V_p \cdot V_э}{V_a \cdot M \cdot 1000} = 0{,}0015 \cdot C_x, \quad (1)$$

где C_x — объемная концентрация аналита, нг/см^3;

V_p — объем раствора для экстракции (в данном случае 100 см^3);

$V_э$ — объем элюата (в данном случае 1,5 см^3);

V_a — аликвота неразбавленного экстракта, нанесенного на иммуноаффинную колонку (в данном случае 5 см^3);

M — масса анализируемой пробы (в данном случае 20 г);

1000 — коэффициент, введенный для пересчета массовой доли токсина, рассчитанной в единицах нг/г (что эквивалентно мкг/кг), мг/кг.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных измерений, если соблюдены условия повторяемости (см. 12.2).

12 Метрологические характеристики и контроль точности

12.1 Метрологические характеристики

При соблюдении всех регламентируемых условий проведения измерения в точном соответствии с данной методикой погрешность (и ее составляющие) результатов измерения при доверительной вероятности P = 0,95 не превышает значений, приведенных в таблице 5 для соответствующих диапазонов концентраций (согласно ГОСТ ИСО 5725-1, ГОСТ ИСО 5725-2, ГОСТ ИСО 5725-3, ГОСТ ИСО 5725-4, ГОСТ ИСО 5725-5, ГОСТ ИСО 5725-6).

Таблица 5 — Значения характеристики погрешности, нормативов оперативного контроля точности, повторяемости, воспроизводимости

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций*, мг/кг, (средняя полнота извлечения, %)	Показатель точности (границы относительной погрешности P = 0,95), ± δ, %	Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторяемости) σ_r, %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости) σ_R, %	Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений) r, %	Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях) R, %, (P = 0,95)
Токсин Т-2						
Пищевая продукция для детей, беременных и кормящих женщин на зерновой основе	0,0015—0,15 (75,5)	65	7,6	10,7	22	30
Зерно и зернопродукты	0,0015—0,15 (84,9)	52	9,2	12,9	26	37

Окончание таблицы 5

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций*, мг/кг, (средняя полнота извлечения, %)	Показатель точности (границы относительной погрешности $P = 0,95$), $\pm \delta$, %	Показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторяемости) σ_r, %	Показатель воспроизводимости (среднеквадратичное отклонение воспроизводимости) σ_R, %	Предел повторяемости (значение допустимого расхождения между двумя результатами параллельных определений) r, %	Предел воспроизводимости (значение допустимого расхождения между двумя результатами измерений, полученных в разных лабораториях) R, %, ($P = 0,95$)
Токсин НТ-2						
Пищевая продукция для детей, беременных и кормящих женщин на зерновой основе	0,0075—0,15 (80,5)	67	8,3	11,7	24	33
Зерно и зернопродукты	0,0075—0,15 (87,9)	54	9,1	12,8	26	36
* Диапазон определяемого содержания токсина установлен в соответствии с диапазоном измерений с учетом фактора разведения и степени извлечения.						

12.2 Проверка приемлемости результатов параллельных определений

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости (сходимости), осуществляют в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-2—2003 (подраздел 5.2). Расхождение между результатами измерений не должно превышать предела повторяемости r (см. таблицу 5).

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, проводят с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-2—2003 (подраздел 5.3). Расхождение между результатами измерений, полученными двумя лабораториями, не должно превышать предела воспроизводимости R (см. таблицу 5).

За результат измерений принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает предела повторяемости:

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le r, \qquad (2)$$

где X_1, X_2 — результаты параллельных определений, мг/кг;

r — значение предела повторяемости (см. таблицу 5), при этом $r = 2,8 \cdot \sigma_r$.

При невыполнении условия (2) выясняют причины превышения предела повторяемости, устраняют их и вновь выполняют измерения.

Расхождение между результатами двух измерений, выполненных в двух разных лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости:

$$\frac{|X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le R, \qquad (3)$$

где X_1, X_2 — результаты двух измерений, выполненных в разных лабораториях, мг/кг;

R — предел воспроизводимости, мг/кг (см. таблицу 5).

13 Оформление результатов

Результат измерений представляют в следующем виде:

$$(\overline{X} \pm \Delta), \text{ мг/кг, при вероятности } P = 0,95,$$

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

Δ — граница абсолютной погрешности, мг/кг, вычисляемой по формуле

$$\Delta = \delta \cdot \overline{X} / 100 , \quad (4)$$

где δ — граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, см. таблицу 5), %.

Если содержание компонента меньше нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат измерений представляют в следующем виде:

содержание токсина НТ-2 в пробе — менее 0,0075 мг/кг;

содержание токсина Т-2 в пробе — менее 0,0015 мг/кг.

УДК 613.2.099: 543.061/062/064:006.354 МКС 71.040.50

Ключевые слова: продукция пищевая специализированная, продукты для детей грудного и младшего возраста, беременных и кормящих женщин, продукты пищевые, зерно, зернопродукты, микотоксины, токсин Т-2, токсин НТ-2, высокоэффективная жидкостная хроматография, тандемная масс-спектрометрия, электрораспылительная ионизация, иммуноаффинная очистка

БЗ 1—2020/126

Редактор *Л.С. Зимилова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 11.12.2019. Подписано в печать 27.12.2019. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,90.
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.

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

gost.e-ecolog.ru