ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 58614— 2019

Продукция пищевая специализированная

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУМОНИЗИНОВ B_1 И B_2 В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ ДЛЯ ПИТАНИЯ ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА НА ОСНОВЕ КУКУРУЗЫ

Метод ВЭЖХ после очистки на иммуноаффинной колонке с предколоночной дериватизацией с флуориметрическим детектированием

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2020

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным унитарным предприятием «Российский научно-технический центр информации по стандартизации, метрологии и оценке соответствия» (ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»)

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

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2019 г. № 844-ст

4 Настоящий стандарт разработан с учетом основных нормативных положений стандарта DIN EN 16187—2015 «Продукты пищевые. Определение фумонозинов B_1 и B_2 в пищевой продукции для детей раннего возраста, содержащей продукты переработки кукурузы. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с предколоночной дериватизацией с флуоресцентным детектированием после очистки на иммуноаффинной колонке» (DIN EN 16187—2015 «Foodstuffs — Determination of fumonisin B_1 and fumonisin B_2 in foods containing processed maize for infants and young children — HPLC method with immunoaffinity column cleanup and fluorescence detection after pre-column derivatization», NEQ)

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, оформление, 2019

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 Краткое описание 2
4 Реактивы 2
5 Оборудование 4
6 Проведение испытания 5
7 Расчеты 7
8 Точность метода 7
9 Протокол испытаний 8
Приложение А (справочное) Данные о точности метода 10
Приложение Б (справочное) Примеры типичных хроматограмм 13
Приложение В (справочное) Сравнение методов по определению фумонизинов в зернах кукурузы, изложенных в настоящем стандарте, с методами, приведенными в ГОСТ EN 13585 и в ГОСТ EN 14352 14

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Продукция пищевая специализированная

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУМОНИЗИНОВ B_1 И B_2 В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ ДЛЯ ПИТАНИЯ ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА НА ОСНОВЕ КУКУРУЗЫ

Метод ВЭЖХ после очистки на иммуноаффинной колонке с предколоночной дериватизацией с флуориметрическим детектированием

Foods for special dietary uses. Determination of fumonisins B_1 and B_2 in corn based products for infant and young children. Method HPLC after immunoaffinity cleanup with pre-column derivatization and fluorescence detection

Дата введения — 2020—04—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения фумонизинов B_1 ($ФВ_1$) и B_2 ($ФВ_2$) в продукции детского питания для детей раннего возраста на основе кукурузы. С этой целью используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с предварительной очисткой на иммуноаффинной колонке с флуориметрическим детектированием (ФЛД) после предколоночной дериватизациии. Этот метод валидирован в ходе межлабораторных испытаний путем исследования естественно и искусственно загрязненных проб с содержанием $ФВ_1$ и $ФВ_2$ от 112 до 458 мкг/кг, содержанием $ФВ_1$ от 89 до 384 мкг/кг и содержанием $ФВ_2$ от 22 мкг/кг до 74 мкг/кг.

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

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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 12.4.021 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

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

ГОСТ 4517 Реактивы. Методы приготовления вспомогательных реактивов и растворов, применяемых при анализе

ГОСТ 4919.2 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 6995 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

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

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

ГОСТ 33303 Продукты пищевые. Методы отбора проб для определения микотоксинов

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

Издание официальное

ГОСТ EN 13585 Продукты пищевые. Определение фумонизинов B_1 и B_2 в кукурузе. Метод ВЭЖХ с применением очистки экстракта методом твердофазной экстракции

ГОСТ EN 14352 Продукты пищевые. Определение фумонизинов B_1 и B_2 в продуктах на основе кукурузы. Метод ВЭЖХ с применением иммуноаффинной колоночной очистки экстракта

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

ГОСТ Р 52501 Вода для лабораторного анализа. Технические условия

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

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

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Краткое описание

Фумонизины экстрагируют из пробы смесью цитратно-фосфатного буферного раствора, метанола и ацетонитрила. Отфильтрованный экстракт разбавляют водой и пропускают через иммуноаффинную колонку, содержащую специфические антитела к фумонизинам. Фумонизины элюируют с колонки метанолом и водой и определяют их количество с помощью ВЭЖХ с ФЛД с предварительной дериватизацией с помощью реагента ортофталевого диальдегида (ОФА).

4 Реактивы

Если не указано иное, используют только химические чистые реактивы, например по ГОСТ 4919.2, для анализа (ч. д. а) и воду степени чистоты 1 в соответствии с ГОСТ Р 52501. Кроме того, чистота растворителей должна быть не ниже степени чистоты для ВЭЖХ. Можно использовать имеющиеся на рынке растворы, свойства которых эквивалентны вышеуказанным.

ВНИМАНИЕ! Утилизация отходов растворителя должна быть произведена в соответствии с действующими законами в области защиты окружающей среды и нормативными актами об охране окружающей среды.

4.1 Ацетонитрил.

ВНИМАНИЕ! Ацетонитрил является опасным веществом. Пробы, отобранные в соответствии с ГОСТ 33303, взбалтывают с помощью орбитального шейкера в вытяжном шкафу. После взбалтывания пробы должны быть отфильтрованы в вытяжном шкафу.

4.2 Метанол.

4.3 Ортофталевый диальдегид (ОФА).

4.4 Раствор лимонной кислоты, молярная концентрация c ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) = 100 моль/м^3.

21,0 г $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ растворяют в воде по ГОСТ 6709 и разбавляют водой до объема 1 дм^3.

4.5 Раствор натрия фосфорнокислого двухзамещенного c (Na_2HPO_4) = 200 моль/м^3.

28,4 г Na_2HPO_4 растворяют в воде и разбавляют водой до объема 1 дм^3.

4.6 2-меркаптоэтанол.

4.7 Раствор цитратно-фосфатный буферный.

Один объем раствора лимонной кислоты (4.4) смешивают с одним объемом раствора натрия фосфорнокислого двухзамещенного (4.5).

4.8 Экстрагент.

Два объема цитрат-фосфатного буферного раствора (4.7) смешивают с одним объемом метанола по ГОСТ 6995 (4.2) и одним объемом ацетонитрила (4.1).

4.9 Кислота ледяная уксусная.

4.10 Фосфатно-хлоридный буфер (PBS), c (NaCl) = 137 моль/м^3, c (KCl) = 2,7 моль/м^3, c (фосфатный буфер) = 10 моль/м^3, pH = 7,4 при T = 25 °С.

Одну таблетку из имеющихся на рынке веществ PBS растворяют в 200 см^3 воды.

4.11 Смесь А, состоящая из ацетонитрила и воды.

Один объем ацетонитрила (4.1) смешивают с одним объемом воды. Этот растворитель используют для приготовления растворов по ГОСТ 4517 для доведения до необходимого объема.

4.12 Смесь В, состоящая из ацетонитрила и воды.

Три объема ацетонитрила (4.1) смешивают с семью объемами воды. Этот растворитель используют для приготовления градуировочных растворов и для повторного разведения высушенных экстрактов после очистки на иммуноаффинной колонке.

4.13 Раствор натрия тетраборнокислого c ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) = 100 моль/м^3.

3,8 г $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ растворяют в 100 см^3 воды.

4.14 Раствор ОФА-реагента.

40 мг ОФА (4.3) растворяют в 1 см^3 метанола (4.2) и разбавляют 5 см^3 раствора тетрабората натрия (4.13). Добавляют 50 мм^3 2-меркаптоэтанола (4.6) и перемешивают в течение 1 мин. Этот раствор реактива остается стабильным при комнатной температуре без доступа света в закрытом флаконе из темного стекла в течение 1 нед.

4.15 Подвижная фаза для ВЭЖХ.

4.15.1 Подвижная фаза А для ВЭЖХ.

30 объемов ацетонитрила (4.1) смешивают с 69 объемами воды и одним объемом ледяной уксусной кислоты (4.9).

4.15.2 Подвижная фаза В для ВЭЖХ.

60 объемов ацетонитрила (4.1) смешивают с 39 объемами воды и одним объемом ледяной уксусной кислоты (4.9).

4.16 Колонка иммуноаффинная.

Иммуноаффинная колонка должна содержать антитела к $ФВ_1$ и $ФВ_2$. Общая сорбционная емкость колонки по отношению к фумонизинам должна составлять не менее 5 мкг; полнота извлечения должна быть не менее 80 % для суммы $ФВ_1$ и $ФВ_2$, если будет наноситься стандартный раствор, содержащий по 5 мкг каждого из фумонизинов в PBS. Перед использованием колонки должны быть нагреты до комнатной температуры. С помощью этих колонок достигается рабочий диапазон метода на уровне 5000 мкг/кг суммарного количества фумонизинов. В случае использования колонок с сорбционной емкостью менее 5 мкг фумонизинов, уменьшается и рабочий диапазон данного метода.

4.17 Сертифицированный стандартный раствор фумонизина B_1 ($ФВ_1$), растворенный в смеси из одной объемной части ацетонитрила и одной объемной части воды, с массовой концентрацией ρ ($ФВ_1$) = 50 мкг/см^3 (например, Biopure RK 002003 или аналогичный раствор).

4.18 Сертифицированный стандартный раствор фумонизина B_2 ($ФВ_2$), растворенный в смеси из одной объемной части ацетонитрила и одной объемной части воды, с массовой концентрацией ρ ($ФВ_2$) = 50 мкг/см^3 (например, Biopure RK 002004 или аналогичный раствор).

ВНИМАНИЕ! Фумонизины являются нефротоксическими, гепатотоксическими и канцерогенными соединениями для крыс и мышей и считаются Международным агентством по изучению рака (IARC) потенциально канцерогенными для человека. С этими препаратами следует обращаться с особой осторожностью. Перчатки и защитные очки следует использовать в течение всех исследований, и все этапы подготовки стандартных растворов и растворов проб должны быть выполнены в вытяжном шкафу в соответствии с ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.1.007, ГОСТ 12.4.021.

4.19 Основной раствор смеси $ФВ_1$ и $ФВ_2$.

Приготавливают основной раствор смеси из $ФВ_1$ и $ФВ_2$, отмеряя пипеткой по ГОСТ 29227 2000 мм^3 сертифицированного стандартного раствора $ФВ_1$ (4.17) и 500 мм^3 сертифицированного стандартного раствора $ФВ_2$ (4.18) в стеклянный флакон. Флакон закрывают и тщательно встряхивают, получая основной раствор, содержащий 40,0 мкг/см^3 $ФВ_1$ и 10,0 мкг/см^3 $ФВ_2$.

4.20 Разбавленный основной раствор смеси $ФВ_1$ и $ФВ_2$.

500 мкл основного раствора смеси (4.19) отмеряют пипеткой в градуированную мерную колбу вместимостью 10 см^3. Доводят раствор до метки смесью В, состоящей из ацетонитрила и воды (4.12),

и тщательно встряхивают, для того чтобы получить разбавленный основной раствор, содержащий 2,0 мкг/см^3 $ФВ_1$ и 0,5 мкг/см^3 $ФВ_2$. Полученный раствор хранят при температуре ниже 4 °С, и он остается стабильным при таких условиях не менее 6 мес.

4.21 Растворы градуировочные смеси фумонизинов для ВЭЖХ.

Пять градуировочных растворов смеси фумонизинов для ВЭЖХ готовят в градуированных мерных колбах по ГОСТ 1770 вместимостью 5 мл путем дальнейшего разведения разбавленного основного раствора фумонизинов ФВ (4.20) в соответствии с таблицей 1. Каждый градуировочный раствор доводят до метки 5 см^3 смесью В, состоящей из ацетонитрила и воды (4.12), и тщательно перемешивают. Данный раствор хранят при температуре ниже 4 °С, и он остается стабильным в таких условиях не менее 6 мес.

Таблица 1 — Приготовление градуировочных растворов смеси фумонизинов для ВЭЖХ

Градуировочный раствор для ВЭЖХ	Разбавленный основной раствор смеси ФВ (4.20) мм^3	Конечная концентрация градуировочных растворов смеси ФВ (4.21)		Эквивалентные количества $ФВ_1$ и $ФВ_2$ в пробе[1)]	
		$ФВ_1$, мкг/см^3	$ФВ_2$, мкг/см^3	$ФВ_1$, мкг/кг	$ФВ_2$, мкг/кг
1	100	0,04	0,01	20,0	5,0
2	200	0,08	0,02	40,0	10,0
3	400	0,16	0,04	80,0	20,0
4	1 000	0,40	0,10	200,0	50,0
5	2 400	0,96	0,24	480,0	120,0

[1)] Для экстракта пробы, повторно растворенной в 500 мкл смеси В, состоящей из ацетонитрила и воды (4.12).

5 Оборудование

Используют лабораторную посуду и лабораторное оборудование по ГОСТ 25336.

5.1 Весы аналитические, пригодные для взвешивания, предел погрешности 0,000 1 г.

5.2 Весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1, пригодные для взвешивания, предел погрешности до 0,1 г.

5.3 Баня водяная с регулируемым термостатом.

5.4 Колбы Эрленмейера, 250 см^3, с завинчивающимися крышками.

5.5 Встряхиватель лабораторный орбитальный.

5.6 Центрифуга, обеспечивающая центробежное ускорение до 3000 g.

5.7 Пробирки центрифужные, 250 см^3, с завинчивающимися крышками.

5.8 Микрошприцы и микропипетки градуированные вместимостью 100, 200 или 1000 мм^3.

5.9 Пипетки вместимостью 5, 10 или 25 см^3.

5.10 Устройство для вакуумной фильтрации с возможностью присоединения иммуноаффинных колонок (4.16).

5.11 Резервуары (вместимостью 25 см^3) и адаптеры для колонок.

5.12 Насос вакуумный.

5.13 Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026, например качественная, прочная, быстрой пропускной способности, диаметром 24 см и размером пор 30 мкм или аналогичная.

5.14 Фильтры из стеклянного микроволокна размером пор 1,6 мкм или аналогичные.

5.15 Блок нагревательный с подачей азота или воздуха.

5.16 Флаконы стеклянные вместимостью от 4 до 12 см^3 и с завинчивающимися крышками.

5.17 Флаконы стеклянные для автоматического пробоотборника для ВЭЖХ вместимостью 1,8 см^3 с крышками (виалы).

5.18 Вставка стеклянная вместимостью 250 мм^3 для виал.

5.19 Встряхиватель типа «Вортекс» или аналогичное перемешивающее устройство.

5.20 Система для ВЭЖХ в указанной ниже комплектации.

5.20.1 Система ввода проб.

5.20.2 Насос для подвижной фазы (двух-, трех- или четырехканальный), который способен создавать бинарный градиент при скорости потока 1 см^3/мин.

5.20.3 Пробоотборник автоматический, способный выполнять автоматическую предколоночную дериватизацию с ОФА-реагентом, указанным в 6.4.1.

5.20.4 Колонка для ВЭЖХ, заполненная обращенно-фазовым сорбентом, например: колонка С18, заполненная обращенно-фазовым сорбентом, размерами 150 × 4,6 мм, 5 мкм, с подходящей предколонкой или с установленным на входе защитным фильтром, который обеспечивает приемлемую способность удерживать и разделять $ФВ_1$ и $ФВ_2$.

По результатам исследований признаны подходящими колонки С18 SymmetryShield компании Waters, Zorbax SB-C18 компании Agilent или аналогичные колонки.

5.20.5 Термостат колонок, который может работать при температуре 20 °С.

Примечание — Колонки С18, заполненные обращенно-фазовым сорбентом, также могут быть использованы при комнатной температуре.

5.20.6 Детектор флуоресцентный, снабженный проточной кюветой, позволяющий проводить измерения при длине волны возбуждения 335 нм и длине волны эмиссии 440 нм.

5.20.7 Устройство записывающее, интегратор или система компьютерная обработки данных.

5.21 Настройки линейного градиента.

Условия градиента представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Условия для градиентного элюирования

Время, мин	Скорость потока, $см^3$/мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза В, %
0,00	1,00	60	40
5,00	1,00	60	40
26,00	1,00	12	88
29,00	1,00	12	88
29,10	1,00	—	100
30,00	1,00	—	100
30,10	1,00	60	40
38,00	1,00	60	40

Вышеуказанная программа градиента при использовании колонки С18 SymmetryShield компании Waters гарантированно обеспечивает приемлемую степень элюирования $ФВ_1$ и $ФВ_2$. Применение другой колонки может потребовать корректировки этих условий до достижения приемлемого разделения пиков.

6 Проведение испытания

6.1 Экстракция

Пробу измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, а затем тщательно перемешивают, для того чтобы обеспечить однородную консистенцию.

Измельченную для анализа пробу массой 20 г, измеренной с точностью до 0,1 г, помещают в колбу Эрленмейера (5.4). Добавляют 100 $см^3$ экстрагента (4.8) и закрывают колбу завинчивающейся крышкой. Колбу нагревают в течение 60 мин при температуре 55 °С (в статическом состоянии) на водяной бане с регулируемым термостатом (5.3). Колбу помещают в лабораторный орбитальный встряхиватель (5.5) и встряхивают в течение 30 мин при комнатной температуре. Пробу переносят в центрифужную пробирку (5.7) и центрифугируют в течение 15 мин при центробежном ускорении 3000 g (5.6). Содержимое колбы фильтруют через фильтровальную бумагу (5.13) и отбирают 10 $см^3$ фильтрата. 10 $см^3$ фильтрата разбавляют 40 $см^3$ воды и перемешивают. Раствор фильтруют через фильтр из стеклянного микроволокна (5.14), отбирают 25 $см^3$ фильтрата (что соответствует 1 г анализируемой пробы) и непосредственно после этого (в течение следующего часа) очищают на иммуноаффинной колонке.

6.2 Очистка экстракта на иммуноафинной колонке

Иммуноаффинную колонку (4.16) соединяют с устройством для вакуумной фильтрации (5.10) и прикрепляют резервуар. Не допускается сливание раствора из колонки для обеспечения его хранения. Разбавленный отфильтрованный экстракт объемом 25 $см^3$ добавляют в резервуар колонки. Экстракт элюируют со скоростью приблизительно одна капля в секунду. Колонку промывают 10 $см^3$ раствора PBS (4.10), а затем 2 $см^3$ воды со скоростью приблизительно одна капля в секунду. Воду удаляют путем пропускания воздуха или азота через колонку в течение 5 с. Стеклянный флакон или пробирку устанавливают под колонкой.

Фумонизины элюируют дважды: метанолом по 1 $см^3$ (4.2) и один раз 2 $см^3$ воды, как указано ниже.

1 $см^3$ метанола добавляют в колонку. Жидкость пропускают через колонку под небольшим давлением (например, с помощью резиновой груши для пипеток Пастера или шприца) до появления первой капли. Кран немедленно закрывают. Через 1 мин кран открывают. Элюату дают протечь под действием силы тяжести до тех пор, пока жидкость не достигнет верхнего слоя колонки. Кран немедленно закрывают. Через 1 мин добавляют вторую порцию метанола объемом 1 $см^3$. Кран открывают, и половине жидкости (около 500 $мм^3$) дают протечь через колонку под действием силы тяжести. Кран закрывают, снова открывают через 1 мин, а оставшаяся жидкость элюируется под действием силы тяжести. Остатки метанола удаляют из колонки, пропуская через колонку воздух или азот.

Добавляют 2 $см^3$ воды, а жидкость элюируют из колонки под действием силы тяжести. Остатки жидкости удаляют из колонки, пропуская через нее воздух или азот. Элюаты упаривают досуха потоком воздуха или азота при температуре около 55 °С (5.15). Остаток повторно растворяют в 500 $мм^3$ смеси В, состоящей из ацетонитрила и воды (4.12). Стеклянный флакон закрывают крышкой и перемешивают во встряхивателе (5.19) в течение 30 с, обеспечивая тщательную промывку нижней части флакона растворителем. Флакон хранят при температуре 4 °С до проведения ВЭЖХ в течение 1 нед.

6.3 Метод искусственного внесения фумонизинов

Для определения полноты извлечения в репрезентативную измельченную пробу продукции детского питания для детей раннего возраста, не содержащего фумонизинов, добавляют раствор смеси фумонизинов. Для его приготовления основной раствор смеси $ФВ_1$ и $ФВ_2$ (4.19) разбавляют соответственно смесью А, состоящей из ацетонитрила с водой (4.11). К данной пробе не допускается добавлять более 1 $см^3$ основного раствора смеси фумонизинов. Массовая концентрация фумонизина в основном растворе смеси фумонизинов должна соответствовать выбранной добавке. Пробу, искусственно загрязненную фумонизином, оставляют на ночь для обеспечения испарения растворителя.

6.4 Дериватизация и количественное определение с помощью ВЭЖХ

6.4.1 Программа автоматизированной предколоночной дериватизации

110 $мм^3$ экстракта переносят в виалу для ВЭЖХ, содержащий стеклянную вставку (5.18). Виалу с экстрактом пробы помещают в автоматический пробоотборник.

Показано, что перечисленные ниже условия обеспечивают удовлетворительные результаты.

Для того чтобы отделить промывочный раствор от ОФА-реагента (4.14), в шприц по ГОСТ ISO 7886-1 набирают 5 $мм^3$ воздуха. Чтобы промыть петлю и иглу, набирают 50 $мм^3$ ОФА-реагента. Содержимое шприца отправляют в слив. Далее набирают 110 $мм^3$ ОФА-реагента и добавляют его в виалу со стеклянной вставкой, содержащую 110 $мм^3$ пробы экстракта или градуировочного раствора. Петлю и иглу промывают смесью А, состоящей из ацетонитрила и воды (4.11). Отбирают 55 $мм^3$ раствора пробы после дериватизации и возвращают в стеклянную вставку виалы; этот процесс повторяют четыре раза. Петлю и иглу промывают промывочным раствором (4.11). Время ожидания составляет 20 с. Вводят в хроматограф 50 $мм^3$ пробы. Петлю и иглу промывают пять раз смесью А, состоящей из ацетонитрила и воды (4.11). Эта процедура автоматической дериватизации длится 2,5 мин.

Примечание — В зависимости от применяемого автоматического пробоотборника могут применяться и различные условия предколоночной дериватизации (объемы, программа дериватизации и т. д.), причем необходимо учитывать, что сигналы (площадь или высота пика фумонизина) $ФВ_1$ или $ФВ_2$ в экстракте пробы должны находиться в пределах диапазона градуировки.

6.4.2 ВЭЖХ-анализ

Если оборудование отрегулировано должным образом, то вводят 50 $мм^3$ дериватизированных градуировочных растворов и растворов экстрактов проб. Повторную градуировку с градуировочными

растворами следует проводить периодически, даже если исследуют растворы экстракта дериватизированного образца. Частота проведения повторной калибровки зависит от стабильности хроматографической системы. Типичные хроматограммы естественно и искусственно загрязненных проб продукции детского питания для детей раннего возраста на основе кукурузы представлены на рисунках Б.1 и Б.2 приложения А.

6.4.3 Идентификация пиков

Пики $ФВ_1$ и $ФВ_2$ в экстракте пробы идентифицируют путем сравнения их времени удерживания со временем удерживания пиков градуировочных растворов.

6.4.4 Определение

Определение методом внешней калибровки проводят путем интегрирования площадей пиков или определения высоты пиков и сравнения полученного значения с градуировочным графиком. Сигналы (площадь пика или высота пика) от $ФВ_1$ или $ФВ_2$ в экстракте пробы должны находиться в пределах диапазона градуировки. Если сигнал от $ФВ_1$ и (или) $ФВ_2$ в экстракте пробы выше сигнала градуировочного раствора с наивысшей концентрацией, то экстракт пробы разбавляют смесью В, состоящей из ацетонитрила и воды (4.12), до тех пор пока не будет достигнут диапазон градуировки, и подвергают его повторному анализу. Коэффициент разбавления должен быть включен в уравнение (1).

7 Расчеты

Масса каждого фумонизина m_a, выраженная в нанограммах, соответствующая площади пика или высоте пика экстракта пробы, считывается из градуировочного графика.

Массовую долю каждого фумонизина w_i, выраженную в микрограммах на килограмм, рассчитывают в пробе в соответствии с уравнением

$$W_i = \frac{m_a \cdot V_t \cdot D}{W \cdot V_i}, \quad (1)$$

где m_a — масса каждого фумонизина в аликвотной доле раствора экстракта пробы для анализа после дериватизации, введенного в колонку для ВЭЖХ, нг;

V_t — объем раствора пробы для анализа после дериватизации, мкл (V_t = 220 мм^3);

D — коэффициент разведения, который может быть применен;

W — эквивалентная масса раствора пробы после дериватизации, г (W = 0,22 г в 110 мм^3 раствора экстракта пробы);

V_i — введенный объем раствора пробы для анализа, мкл (V_i = 50 мм^3).

8 Точность метода

8.1 Общие положения

Подробная информация о межлабораторных испытаниях для определения точности метода приведена в таблицах А.1—А.3 приложения А. Значения, полученные в результате этих межлабораторных испытаний, не обязательны для применения к другим диапазонам концентраций и/или другим типам матриц, отличным от тех, которые указаны в приложении В.

8.2 Повторяемость

Абсолютное расхождение между результатами двух отдельно проведенных испытаний, полученных одним лаборантом на идентичном материале для исследований с использованием такого же оборудования в течение короткого промежутка времени, не должно превышать предела повторяемости r более чем в 5 % случаев (ГОСТ Р ИСО 5725-1, ГОСТ Р ИСО 5725-2).

Значения для $ФВ_1$ + $ФВ_2$ в продукции детского питания для детей раннего возраста на основе кукурузы приведены ниже:

$\bar{x}$ = 112 мкг/кг,	r = 51,0 мкг/кг	(искусственно контаминированные);
$\bar{x}$ = 293 мкг/кг,	r = 56,6 мкг/кг	(искусственно контаминированные);
$\bar{x}$ = 211 мкг/кг,	r = 135,5 мкг/кг	(естественно контаминированные);
$\bar{x}$ = 322 мкг/кг,	r = 126,3 мкг/кг	(естественно контаминированные);
$\bar{x}$ = 458 мкг/кг,	r = 107,5 мкг/кг	(естественно контаминированные).

Значения для $ФВ_1$ в продуктах питания для детей раннего возраста на основе кукурузы приведены ниже:

$\bar{x}$ = 89 мкг/кг,	r = 40,3 мкг/кг	(искусственно контаминированные);
$\bar{x}$ = 240 мкг/кг,	r = 45,4 мкг/кг	(искусственно контаминированные);
$\bar{x}$ = 177 мкг/кг,	r = 16,2 мкг/кг	(естественно контаминированные);
$\bar{x}$ = 258 мкг/кг,	r = 51,2 мкг/кг	(естественно контаминированные);
$\bar{x}$ = 384 мкг/кг,	r = 91,3 мкг/кг	(естественно контаминированные).

Значения для $ФВ_2$ в продуктах питания для детей раннего возраста на основе кукурузы приведены ниже:

$\bar{x}$ = 22 мкг/кг,	r = 13,2 мкг/кг	(искусственно контаминированные);
$\bar{x}$ = 53 мкг/кг,	r = 11,5 мкг/кг	(искусственно контаминированные);
$\bar{x}$ = 34 мкг/кг,	r = 22,1 мкг/кг	(естественно контаминированные);
$\bar{x}$ = 51 мкг/кг,	r = 18,2 мкг/кг	(естественно контаминированные);
$\bar{x}$ = 74 мкг/кг,	r = 17,6 мкг/кг	(естественно контаминированные).

8.3 Воспроизводимость результатов

Абсолютное расхождение между результатами двух отдельно проведенных испытаний, полученных в двух лабораториях на идентичном материале для исследований, не должно превышать предела повторяемости R более чем в 5 % случаев (ГОСТ Р ИСО 5725-1, ГОСТ Р ИСО 5725-2).

Значения для $ФВ_1 + ФВ_2$ в продуктах питания для детей раннего возраста на основе кукурузы приведены ниже:

$\bar{x}$ = 112 мкг/кг,	R = 83,2 мкг/кг	(искусственно контаминированные);
$\bar{x}$ = 293 мкг/кг,	R = 136,9 мкг/кг	(искусственно контаминированные);
$\bar{x}$ = 211 мкг/кг,	R = 157,1 мкг/кг	(естественно контаминированные);
$\bar{x}$ = 322 мкг/кг,	R = 218,1 мкг/кг	(естественно контаминированные);
$\bar{x}$ = 458 мкг/кг,	R = 213,4 мкг/кг	(естественно контаминированные).

Значения для $ФВ_1$ в продуктах питания для детей раннего возраста на основе кукурузы приведены ниже:

$\bar{x}$ = 89 мкг/кг,	R = 65,2 мкг/кг	(искусственно контаминированные);
$\bar{x}$ = 240 мкг/кг,	R = 107,2 мкг/кг	(искусственно контаминированные);
$\bar{x}$ = 177 мкг/кг,	R = 127,1 мкг/кг	(естественно контаминированные);
$\bar{x}$ = 258 мкг/кг,	R = 132,2 мкг/кг	(естественно контаминированные);
$\bar{x}$ = 384 мкг/кг,	R = 165,5 мкг/кг	(естественно контаминированные).

Значения для $ФВ_2$ в продуктах питания для детей раннего возраста на основе кукурузы приведены ниже:

$\bar{x}$ = 22 мкг/кг,	R = 23,0 мкг/кг	(искусственно контаминированные);
$\bar{x}$ = 53 мкг/кг,	R = 32,2 мкг/кг	(искусственно контаминированные);
$\bar{x}$ = 34 мкг/кг,	R = 34,7 мкг/кг	(естественно контаминированные);
$\bar{x}$ = 51 мкг/кг,	R = 44,0 мкг/кг	(естественно контаминированные);
$\bar{x}$ = 74 мкг/кг,	R = 58,5 мкг/кг	(естественно контаминированные).

9 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать следующие минимальные данные:

- информация, необходимая для идентификации пробы (вид пробы, ее происхождение, наименование пробы);
- ссылка на настоящий стандарт;

- дата и способ отбора пробы (если известны);
- дата поступления пробы в лабораторию;
- дата проведения испытания;
- результаты испытания с указанием единиц измерения;
- все особенности, установленные в ходе проведения испытания;
- все операции, не установленные в методике или рассматриваемые как необязательные и которые могут повлиять на результат испытания.

Приложение А
(справочное)

Данные о точности метода

Данные, приведенные в таблицах А.1—А.3, получены в результате межлабораторных испытаний, которые проводились в соответствии с протоколом испытания на предмет установления ценности параметров аналитических методов.

Таблица А.1 — Данные о точности метода и данные о полноте извлечения для $ФВ_1$ + $ФВ_2$ в продукции детского питания для детей раннего возраста

Проба	1[1)]	2[2)]	3[3)]	4[4)]	5[5)]
Год проведения межлабораторного испытания	2009	2009	2009	2009	2009
Количество лабораторий-участников	10[6)]	10[6)]	10[6)]	10[6)]	10[6)]
Количество лабораторий, оставшихся после исключения допустивших ошибки	8	10	10	10	9
Количество лабораторий, допустивших ошибки	2	0	0	0	1
Количество принятых результатов	16	20	20	20	18
Среднее арифметическое $\bar{x}$, мкг/кг	111,6	293,4	211,2	322,5	458,0
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/кг	18,2	20,2	48,4	45,1	38,4
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	16,3	6,9	22,9	14,0	8,4
Предел повторяемости r [$r = 2,8 \times s_r$], мкг/кг	51,0	56,6	135,5	126,3	107,5
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/кг	29,7	48,8	56,1	77,9	76,2
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	26,6	16,6	26,6	24,1	16,6
Предел воспроизводимости R [$R = 2,8 \times s_R$], мкг/кг	83,2	136,9	157,1	218,1	213,4
Полнота извлечения, %	89	94	—	—	—
Значение HorRat	1,2	0,9	1,3	1,3	0,9
Значение HorRat	1,2	0,9	1,3	1,3	0,9

[1)] Проба, искусственно внесенная Bambix fijne granen, содержит пшеницу, овес, рис, просо, ячмень, кукурузу и рожь.
[2)] Проба, искусственно внесенная (мука из обработанной амилазой кукурузы и тапиоки, специи и витамин B_1).
[3)] Проба, естественно загрязненная (печенья, содержащие пшеницу, ячмень, рожь, рис и кукурузу).
[4)] Проба, естественно загрязненная (сухое молоко, растительное масло, рис, кукуруза, сахар, минералы и витамины).
[5)] Проба, естественно загрязненная (предварительно приготовленная мука из пшеницы, овса, ржи, ячменя, риса, проса и кукурузы).
[6)] Одна лаборатория из первоначальных 11 лабораторий-участников исключена из-за полученных в ней недействительных результатов.

Таблица А.2 — Данные о точности метода и данные о полноте извлечения фумонизина B_1 в продукции детского питания для детей раннего возраста

Проба	1[1)]	2[2)]	3[3)]	4[4)]	5[5)]
Год проведения межлабораторного испытания	2009	2009	2009	2009	2009
Количество лабораторий-участников	10[6)]	10[6)]	10[6)]	10[6)]	10[6)]
Количество лабораторий, оставшихся после исключения допустивших ошибки	8	10	10	9	9
Количество лабораторий, допустивших ошибки	2	0	0	1	1
Количество принятых результатов	16	20	20	18	18
Среднее арифметическое $\bar{x}$, мкг/кг	89,1	240,1	176,7	257,6	384,4
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/кг	14,4	16,2	41,5	18,3	32,6
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	16,2	6,8	23,5	7,1	8,5
Предел повторяемости r [$r = 2,8 \times s_r$], мкг/кг	40,3	45,4	116,2	51,2	91,3
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/кг	23,3	38,3	45,4	47,2	59,1
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	26,2	16,0	25,7	18,3	15,4
Предел воспроизводимости R [$R = 2,8 \times s_R$], мкг/кг	65,2	107,2	127,1	132,2	165,5
Полнота извлечения, %	89	96	—	—	—
Значение HorRat	1,1	0,8	1,2	0,9	0,8
Значение HorRat	1,2	0,8	1,2	0,9	0,8

[1)] Проба, искусственно внесенная Bambix fijne granen, содержит пшеницу, овес, рис, просо, ячмень, кукурузу и рожь.

[2)] Проба, искусственно внесенная (мука из обработанной амилазой кукурузы и тапиоки, специи и витамин B_1).

[3)] Проба, естественно загрязненная (печенья, содержащие пшеницу, ячмень, рожь, рис и кукурузу).

[4)] Проба, естественно загрязненная (сухое молоко, растительное масло, рис, кукуруза, сахар, минералы и витамины).

[5)] Проба, естественно загрязненная (предварительно приготовленная мука из пшеницы, овса, ржи, ячменя, риса, проса и кукурузы).

[6)] Одна лаборатория из первоначальных 11 лабораторий-участников исключена из-за полученных в ней недействительных результатов.

Таблица А.3 — Данные о точности метода и данные о полноте извлечения фумонизина B_2 в продукции детского питания для детей раннего возраста

Проба	1[1)]	2[2)]	3[3)]	4[4)]	5[5)]
Год проведения межлабораторного испытания	2009	2009	2009	2009	2009
Количество лабораторий-участников	10[6)]	10[6)]	10[6)]	10[6)]	10[6)]
Количество лабораторий, оставшихся после исключения допустивших ошибки	8	10	10	9	9
Количество лабораторий, допустивших ошибки	2	0	0	1	1
Количество принятых результатов	16	20	20	18	18
Среднее арифметическое $\bar{x}$, мкг/кг	22,5	53,3	34,5	50,8	73,6
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/кг	4,7	4,1	7,9	6,5	6,3
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	21,0	7,6	22,9	12,9	8,6
Предел повторяемости r [$r = 2,8 \times s_r$], мкг/кг	13,2	11,5	22,1	18,2	17,6
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/кг	8,2	11,5	12,4	15,7	20,9
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	36,3	21,6	36,0	30,8	28,4
Предел воспроизводимости R [$R = 2,8 \times s_R$], мкг/кг	23,0	32,2	34,7	44,0	58,5
Полнота извлечения, %	90	85	—	—	—
Значение HorRat	1,3	0,9	1,4	1,2	1,2
Значение HorRat	1,7	1,0	1,6	1,4	1,3

[1)] Проба, искусственно внесенная Bambix fijne granen, содержит пшеницу, овес, рис, просо, ячмень, кукурузу и рожь.

[2)] Проба, искусственно внесенная (мука из обработанной амилазой кукурузы и тапиоки, специи и витамин B_1).

[3)] Проба, естественно загрязненная (печенья, содержащие пшеницу, ячмень, рожь, рис и кукурузу).

[4)] Проба, естественно загрязненная (сухое молоко, растительное масло, рис, кукуруза, сахар, минералы и витамины).

[5)] Проба, естественно загрязненная (предварительно приготовленная мука из пшеницы, овса, ржи, ячменя, риса, проса и кукурузы).

[6)] Одна лаборатория из первоначальных 11 лабораторий-участников исключена из-за полученных в ней недействительных результатов.

Приложение Б
(справочное)

Примеры типичных хроматограмм

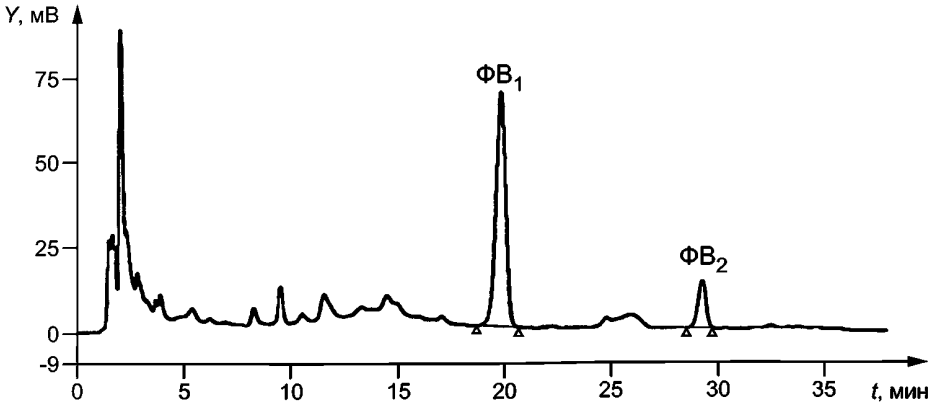


Рисунок Б.1 — Типичная хроматограмма естественно загрязненного образца продукции детского питания для детей раннего возраста (предварительно приготовленная мука из кукурузы и тапиоки, обработанная амилазой), содержащего 250, мкг/кг фумонизина B_1 ($ФВ_1$) и 62,5 мкг/кг фумонизина B_2 ($ФВ_2$)

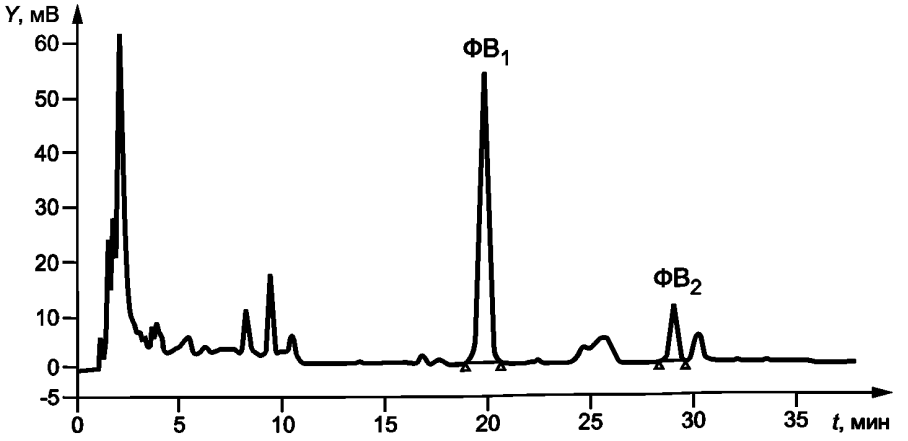


Рисунок Б.2 — Типичная хроматограмма естественно загрязненного образца продукции детского питания для детей раннего возраста (печенье, содержащее пшеницу, ячмень, рожь, рис и кукурузу), содержащего 164,8 мкг/кг $ФВ_1$ и 35,6 мкг/кг $ФВ_2$

Приложение В
(справочное)

Сравнение методов по определению фумонизинов в зернах кукурузы, изложенных в настоящем стандарте, с методами, приведенными в ГОСТ EN 13585 и в ГОСТ EN 14352

Данные, приведенные в таблице В.1, получены в лаборатории, проводившей исследования четырех проб измельченных зерен кукурузы, естественно контаминированных $ФВ_1$ и $ФВ_2$, приведенных в настоящем стандарте, ГОСТ EN 13585 и ГОСТ EN 14352. Результаты представляют собой среднее значение четырех парных показателей. Значения, представленные в таблице В.1, свидетельствуют о возможности применения данного метода также к пробам кукурузной муки, имеющим частицы разных размеров.

Таблица В.1 — Сравнение методов, изложенных в настоящем стандарте, в ГОСТ EN 13585 и в ГОСТ EN 14352

Фумонизины		Метод, изложенный в настоящем стандарте		ГОСТ EN 14352[2)]		ГОСТ EN 13585[4)]	
		Среднее значение, мкг/кг	RSD_r, %	Среднее значение, мкг/кг	RSD_r, %	Среднее значение, мкг/кг	RSD_r, %
Измельченные цельные зерна кукурузы (размер частиц < 500 мкм)	$ФВ_1 + ФВ_2$	580,6[1)]	9	612,5[1)]	12	648,9[1)]	7
	$ФВ_1$	485,0[1)]	10	498,3[1)]	11	509,9[1)]	7
	$ФВ_2$	95,6[1)]	9	114,2[3)]	15	139,0[5)]	8
Измельченные цельные зерна кукурузы (размер частиц > 500 мкм)	$ФВ_1 + ФВ_2$	804,3[1)]	8	791,5[3)]	12	635,9[5)]	7
	$ФВ_1$	640,3[1)]	8	619,1[3)]	14	500,9[5)]	7
	$ФВ_2$	164,0[1)]	9	172,4[1)]	6	135,0[5)]	8
Кукурузная мука (размер частиц от 350 мкм до 500 мкм)	$ФВ_1 + ФВ_2$	210,6[1)]	5	204,5[1)]	3	161,1[5)]	10
	$ФВ_1$	175,2[1)]	5	166,9[1)]	3	135,1[5)]	12
	$ФВ_2$	35,4[1)]	6	37,6[1)]	3	26,0[5)]	5
Кукурузная мука (размер частиц < 350 мкм)	$ФВ_1 + ФВ_2$	3 148,1[1)]	8	3 264,3[1)]	4	2 276,9[5)]	5
	$ФВ_1$	2561,3[1)]	9	2642,6[1)]	4	1868,8[5)]	5
	$ФВ_2$	586,8[1)]	7	621,7[1)]	6	408,1[5)]	8

[1)] Среднее содержание фумонизинов различается в значительной мере ($P < 0,05$, анализ однофакторной дисперсии по Туки с пост-тестом, параметрический тест) от тех, у которых есть сноска b в той же строке.

[2)] Фумонизины экстрагируют из измельченных зерен кукурузы смесью, состоящей из воды-ацетонитрила-метанола, а отфильтрованный экстракт очищают на иммуноаффинной колонке согласно ГОСТ EN 14352.

[3)] Среднее содержание фумонизинов различается в значительной мере ($P < 0,05$, анализ однофакторной дисперсии по Туки с пост-тестом, параметрический тест) от тех, у которых есть сноска a или b в той же строке.

[4)] Фумонизины экстрагируют из измельченных зерен кукурузы смесью, состоящей из воды и метанола, а отфильтрованный экстракт очищают на колонке с насыщенной анионообменной смолой согласно ГОСТ EN 13585.

[5)] Среднее содержание фумонизинов различается в значительной мере ($P < 0,05$, анализ однофакторной дисперсии по Туки с пост-тестом, параметрический тест) от тех, у которых есть сноска a в той же строке.

УДК 543.6:006.354 ОКС 67.050

Ключевые слова: продукция пищевая специализированная, определение фумонизина B_1, определение фумонизина B_2, продукция для питания детей раннего возраста, пищевые продукты на основе кукурузы, метод ВЭЖХ, очистка на иммуноаффинной колонке, флуоресцентное детектирование, предколоночная дериватизация

БЗ 1—2020/96

Редактор *Л.С. Зимилова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 10.12.2019. Подписано в печать 10.01.2020. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,10.
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