ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

КОРМА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Полуколичественное определение содержания афлатоксина B_1 Методы тонкослойной хроматографии

СТ РК ИСО 6651-2011

(ISO 6651:2001, IDT)

Издание официальное

**Комитет технического регулирования и метрологии
Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан
(Госстандарт)**

Астана

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН И ВНЕСЕН республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и сертификации» и Техническим комитетом по стандартизации 44 «Технолог»

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Председателя Комитета технического регулирования и метрологии Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан от 12 августа 2011 года № 411-од

3 Настоящий стандарт идентичен по отношению к международному стандарту ISO 6651:2001 Animal feeding stuffs. Semi-quantitative determination of aflatoxin B_1. Thin-layer chromatographic methods (Корма для животных. Полуколичественное определение содержания афлатоксина В1. Методы тонкослойной хроматографии).

В настоящий стандарт внесены редакционные изменения в связи с особенностями построения государственной системы технического регулирования, которые выделены по тексту курсивом.

Международный стандарт ISO 6651 подготовлен Техническим комитетом ISO/TK 34, *Продукты питания,* Подкомитет SC10, *Корма для животных*.

Перевод с английского языка (en)

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам, приведены в Приложении Д.А.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ 2017 год
ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ 5 лет

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в указателе «Нормативные документы по стандартизации», а текст изменений – в ежемесячных информационных указателях «Государственные стандарты». В случае пересмотра (отмены) или замены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована в информационном указателе «Государственные стандарты»

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета технического регулирования и метрологии Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

КОРМА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ
Полуколичественное определение содержания афлатоксина B_1
Методы тонкослойной хроматографии

Дата введения 2012-07-01

1 Область применения

1.1 Настоящий стандарт устанавливает два метода определения афлатоксина B_1 в кормах для животных. Эти методы могут применяться лишь для полуколичественных определений.

1.2 Метод А применим к следующим простым кормам:

- масличные культуры и выжимки масличных культур, и в частности, арахис, копра, льняное семя, соя, пальма бабассу;
- мука из плодов маниоки;
- прессованные зародыши кукурузы;
- зерновые и зерновые продукты;
- бобовая мука;
- картофельная пульпа и мука.

В присутствии веществ, создающих помехи определению по методу А, рекомендуется выполнять определение согласно методу В.

1.3 Метод В применим к комбикормам и простым кормам, не указанным в 1.2.

Этот метод не применяется к кормам, содержащим цитрусовую пульпу.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные нормативные документы. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного документа, для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного документа (включая все его изменения):

СТ РК 1.9–2007 Государственная система технического регулирования Республики Казахстан. Порядок применения международных, региональных и национальных стандартов иностранных государств, других нормативных документов по стандартизации в Республике Казахстан.

ISO 6498 Animal feeding stuffs − Preparation of test samples (Корма для животных. Подготовка испытуемых проб).[1)]

ПРИМЕЧАНИЕ При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов по ежегодно издаваемому информационному указателю «Нормативные документы по стандартизации» по состоянию на текущий год и соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться замененным (измененным) документом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Общие положения

Испытуемая проба экстрагируется хлороформом, затем фильтруется. Аликвотная проба очищается на колонке с силикагелем.

[1)] *Применяется в соответствии с СТ РК 1.9*

Элюат выпаривается и остаток растворяется в специальном объеме хлороформа или смеси бензола и ацетонитрила.

Аликвотная проба этого раствора анализируется тонкослойной хроматографией, одномерной для метода А и двухмерной для метода В.

Определяется содержание афлатоксина B_1 визуально либо методом фторденситометрии путем изучения хроматограммы в ультрафиолетовом свете и сравнения с известными количествами стандартного афлатоксина B_1, наложенными на ту же пластину, что и экстракт испытуемой пробы.

Идентичность афлатоксина B_1 подтверждается образованием производного гемиацеталя.

4 Реактивы

Используют только реактивы *квалификации «химически чистый»*, а также дистиллированную или деминерализованную воду или воду с эквивалентной чистотой.

4.1 Хлороформ, стабилизированный от (0,5-1,0) % 96%-ного (объемная доля) этилового спирта.

4.2 *н*-гексан.

4.3 Этиловый эфир, безводный, свободный от пероксидов.

4.4 Бензол/ацетонитрил, смесь (98 + 2).

Смешивают 98 объемов бензола с 2 объемами ацетонитрила.

4.5 Хлороформ/метиловый спирт, смесь (97 + 3).

Смешивают 97 объемов хлороформа с 3 объемами метилового спирта.

4.6 Проявляющие растворители

Растворители следует использовать в закрытых камерах. Если указаны насыщенные камеры, для этого прокладывают камеры, впитывающей бумагой, и позволяют содержимому насытиться испарениями растворителя.

4.6.1 Хлороформ/ацетон, смесь (90 + 10).

Смешивают 90 объемов хлороформа с 10 объемами ацетона в ненасыщенной камере.

4.6.2 Этиловый эфир/метиловый спирт/вода, смесь (96 + 3 + 1).

Смешивают 96 объемов этилового эфира, 3 объема метилового спирта и 1 объем воды в ненасыщенной камере.

4.6.3 Этиловый эфир/метиловый спирт/вода, смесь (94 + 4,5 + 1,5).

Смешивают 94 объема этилового эфира с 4,5 объема метилового спирта и 1,5 объема воды в насыщенной камере.

4.6.4 Хлороформ/метиловый спирт, смесь (94 + 6).

Смешивают 97 объемов хлороформа с 3 объемами метилового спирта в насыщенной камере.

4.6.5 Хлороформ/метиловый спирт, смесь (97 + 3).

Смешивают 94 объема хлороформа с 6 объемами метилового спирта в насыщенной камере.

4.7 Силикагель, для колоночной хроматографии, размер частиц от 0,05 мм до 0,20 мм.

4.8 Силикагель, G-HR или эквивалент, для тонкослойной хроматографии.

4.9 Диатомитовая земля (Hyflosupercel), обработанная кислотой.

4.10 Сульфат натрия, безводные гранулы.

4.11 Трифторуксусная кислота.

4.12 Инертный газ, например, азот.

4.13 Серная кислота, 50 % раствор (объемная доля).

4.14 Афлатоксин B_1, стандартный раствор, содержащий 0,1 мкг афлатоксина B_1 на миллилитр, в хлороформе (см. 4.1) или в смеси бензола/ацетонитрила (см. 4.4).

ПРИМЕЧАНИЕ Афлатоксины высококанцерогенны, и работа с ними требует крайней осторожности.

Подготавливают и проверяют раствор следующим образом:

4.14.1 Подготовка маточного раствора и определение концентрации

Подготавливают раствор афлатоксина B_1 в хлороформе (см. 4.1) или смеси бензола/ацетонитрила (см. 4.4) так, чтобы концентрация была между 8 мкг/мл и 10 мкг/мл. Регистрируют спектр поглощения от 330 нм до 370 нм с помощью спектрометра (см. 5.9).

Измеряют оптическую плотность (A) при 363 нм в случае хлороформного раствора или при 348 нм в случае раствора смеси бензола/ацетонитрила.

Рассчитывают концентрацию афлатоксина B_1 в микрограммах на миллилитр раствора по Формуле:

a) для хлороформного раствора

$$\frac{312 \times A \times 1000}{22300}, \qquad (1)$$

b) для раствора смеси бензола/ацетонитрила

$$\frac{312 \times A \times 1000}{19800}, \qquad (2)$$

4.12.2 Разбавление

Разбавляют маточный раствор (см. 4.14.1), избегая дневного света, чтобы получить стандартный раствор с концентрацией афлатоксина B_1 0,1 мкг/мл.

При хранении в холодильнике при 4 °C этот раствор стабилен в течение двух недель.

4.12.3 Испытание хроматографической чистоты раствора.

На пластину (см. 5.7) наносят пятно в 5 мкл стандартного раствора афлатоксина B_1 концентрацией от 8 мкг/мл до 10 мкг/мл (см. 4.14.1). Проявляют хроматограмму по 7.5.1. В ультрафиолетовом свете хроматограмма должна показать только одно пятно, а в исходной зоне нанесения не должно быть видимо никакого свечения.

4.15 Афлатоксин B_1 и B_2 (см. Примечание в 4.14), растворы для качественного испытания, содержащие около 0,1 мкг афлатоксина B_1 и B_2 на миллилитр, в хлороформе (см. 4.1) или в смеси бензола/ацетонитрила (см. 4.4).

Эти концентрации приводятся как руководство. Их следует отрегулировать так, чтобы получить одинаковую интенсивность свечения для обоих афлатоксинов (см. 7.5.1).

5 Оборудование

5.1 Дробилка/мешалка.

5.2 Сито, размер отверстий 1,0 мм.

Подробно см. ISO 565. [1)]

5.3 Вибратор или магнитная мешалка.

5.4 Хроматографические трубки, изготовленные из стекла (внутренний диаметр 22 мм, длина 300 мм) с политетрафторэтиленовой втулкой и резервуаром на 250 мл, закупоренные с нижнего конца хлопчатобумажной тканью или стекловатой.

5.5 Ротационный вакуумный испаритель, с круглодонной колбой на 500 мл.

[1)] ISO 565 Сита испытательные. Металлическое проволочное решето, перфорированная металлическая пластина и листы, изготовленные гальваническим методом. Номинальные размеры отверстий.

5.6 Аппарат тонкослойной хроматографии (ТСХ), то есть необходимый для подготовки пластин (см. 5.7) и нанесения точек (капиллярные пипетки или микрошприцы), камеры для проявления и распылитель для нанесения серной кислоты (см. 4.13) на пластины.

5.7 Стеклянные пластины ТСХ, 200 мм × 200 мм, подготовленные согласно описанию ниже (указанные количества достаточны для покрытия пяти пластин).

Помещают 30 г силикагеля (см. 4.8) в коническую колбу, добавляют 60 мл воды, закупоривают и встряхивают в течение 1 минуты. Распределяют суспензию по пластинам так, чтобы получить однородный слой 0,25 мм толщиной. Оставляют высохнуть на воздухе и затем хранят в осушителе, содержащем силикагель. В момент использования активируют пластины, поместив их в шкаф при 110 °С на 1 час.

Готовые пластины считаются пригодными, если они дают результаты, схожие с тем, что получены с пластинами, подготовленными, как указано выше.

5.8 Ультрафиолетовая лампа с длинной волны 360 нм.

Интенсивность излучения должна делать возможным четкое выделение пятна в 1,0 нг афлатоксина B_1 на пластине ТСХ на расстоянии 10 см от лампы.

ПРИМЕЧАНИЕ Ультрафиолетовый свет опасен для зрения. Надевайте защитные очки.

5.9 Спектрометр, подходящий для измерений в ультрафиолетовой части спектра.

5.10 Фтороденситометр (по желанию).

5.11 Рифленая фильтр-бумага.

5.12 Градуированная пробирка, емкостью 10,0 мл, с полиэтиленовой пробкой.

5.13 Коническая колба, емкостью 500 мл, с круглой стеклянной пробкой.

5.14 Пипетка, емкостью 50 мл.

5.15 Аналитические весы, с точностью взвешивания до 0,001 г.

ПРИМЕЧАНИЕ Допускается использовать аппаратуру, мерную посуду, реактивы, имеющие аналогичные метрологические характеристики или выше. Применяемые средства измерений подлежат испытаниям с целью утверждения типа или метрологической аттестации, поверки средств измерений и внесению в реестр Республики Казахстан в соответствии с законодательством в области обеспечения единства измерений.

6 Отбор проб

Отбирают лабораторный образец из материала, подлежащего отбору, в соответствии со стандартом для соответствующего материала, если отбор проб для определения афлатоксина включен в область его применения.

В случае отсутствия соответствующего стандарта заинтересованные стороны должны прийти к соглашению с учетом характеристик материала, из которого отбираются пробы.

7 Процедура

7.1 Подготовка испытуемого образца

7.1.1 Если образец содержит более 5% жира, перед измельчением он должен быть обезжирен петролейным эфиром.

В таких случаях аналитические результаты должны выражаться по отношению к массе необезжиренного образца.

7.1.2 Измельчают лабораторный образец так, чтобы он полностью прошел через сито (см. 5.2). Тщательно перемешивают (см. ISO 6498).

7.2 Испытуемая проба

Взвешивают с точностью до 0,01 г 50 г подготовленного испытуемого образца в коническую колбу (см. 5.13).

7.3 Экстрагирование

Добавляют к испытуемой пробе (см. 7.2) 25 г диатомитовой земли (см. 4.9), 25 мл воды и 250 мл хлороформа (см. 4.1), точно отмеренных мерным цилиндром. Закупоривают колбу и встряхивают или помешивают в течение 30 минут с помощью вибратора (см. 5.3). Фильтруют через рифленую фильтр-бумагу (см. 5.11), отбросив первых 10 мл фильтрата, а в последующем собирают не менее 50 мл фильтрата.

7.4 Очистка колонки

7.4.1 Подготовка колонки

Наполняют хроматографическую трубку (см. 5.4) на две трети хлороформом (см. 4.1) и добавляют 5 г сульфата натрия (см. 4.10). Проверяют, чтобы верхняя поверхность слоя сульфата натрия была плоской, затем маленькими порциями добавляют 10 г силикагеля (см. 4.7). Осторожно помешивают после каждого добавления для удаления пузырьков воздуха. Оставляют постоять в течение 15 минут и затем осторожно добавляют 10 г сульфата натрия (см. 4.10). Открывают втулку и позволяют жидкости вытекать до тех пор, пока она не окажется как раз над верхней поверхностью слоя сульфата натрия. Закрывают втулку.

7.4.2 Очистка

Переносят с помощью пипетки (см. 5.14) 50 мл фильтрата, собранного согласно 7.3, в коническую колбу на 250 мл и добавляют 100 мл *н*-гексана (см. 4.2). Перемешивают и количественно переносят смесь в колонку, сполоснув колбу *н*-гексаном. Открывают втулку и позволяют жидкости вытекать со скоростью 8-12 мл/мин до тех пор, пока ее уровень не сравняется с верхней поверхностью слоя сульфата натрия. Закрывают втулку. Сбрасывают собранную жидкость и наливают 100 мл этилового эфира (см. 4.3) в колонку. Вновь открывают втулку и позволяют жидкости вытекать, пока ее уровень не сравняется с верхней поверхностью слоя сульфата натрия. Во время этих операций следят, чтобы колонка не стала сухой.

Элюируют 150 мл смеси хлороформа/метилового спирта (см. 4.5) и собирают элюат целиком в колбу на 500 мл ротационного испарителя (см. 5.5). Выпаривают досуха на нем, предпочтительнее в токе инертного газа (см. 4.12) при температуре не выше 50 °С и при пониженном давлении.

Если нет в наличии ротационного испарителя, используют устройство для кипячения и выпаривают почти досуха на водяной бане.

Количественно переносят остаток, используя хлороформ (см. 4.1) или смесь бензола/ацетонитрила (см. 4.4) в градуированную пробирку на 10 мл (см. 5.12). Вновь выпаривают раствор, например, на водяной бане, предпочтительнее в токе инертного газа (см. 4.12), и доводят объем до 2,0 мл хлороформом (см. 4.1) или смесью бензола/ацетонитрила (см. 4.4).

7.5 Тонкослойная хроматография

7.5.1 Метод А. Одномерная тонкослойная хроматография

7.5.1.1 Выбор растворителя

Выбор растворителя (см 4.6.1; 4.6.2; 4.6.3; 4.6.4 или 4.6.5) должен быть сделан заранее в целях обеспечения полного отделения афлатоксинов B_1 и B_2, когда пластины будут проявлены, а это зависит от количества задействованных пластин.

Помещают 25 мкл качественного раствора (см. 4.15) на подготовленные пластины (см. 5.7) (одна пластина для каждого проверяемого растворителя).

Следуют процедуре по 7.5.1.2 по проявке, испарению и облучению.

Подходящий растворитель дает два четких пятна.

7.5.1.2 Процедура

На пластину ТСХ (см. 5.7) с помощью капиллярной пипетки или микрошприца наносят, в 20 мм от нижнего края и с интервалом в 20 мм, указанные ниже объемы стандартного раствора афлатоксина B_1 и экстракта:

- 10; 15; 20; 30; и 40 мкл стандартного раствора афлатоксина B_1 (см. 4.14);
- 10 мкл экстракта, полученного по 7.4.2 и, нанося на ту же точку, 20 мкл стандартного раствора афлатоксина B_1 (см. 4.14);
- 10 мкл и 20 мкл экстракта, полученного по 7.4.2.

Проявляют хроматограмму в темноте, используя выбранный проявляющий растворитель (см. 7.5.1.1).

Вынимают пластину из камеры, позволяют растворителям испариться с пластины в темноте и затем осматривают в ультрафиолетовом свете, поместив пластину в 10 см от лампы (5.8). Пятна афлатоксина B_1 дают голубое свечение.

7.5.2 Метод В. Двухмерная тонкослойная хроматография

7.5.2.1 Нанесение растворов (см. Рисунок 1)

Прочерчивают две прямые линии на пластине (см. 5.7), параллельно двум смежным сторонам (50 мм и 60 мм от каждой стороны, соответственно), чтобы установить границы движения линий фронта растворителей. Наносят следующие растворители на пластину, используя капиллярные пипетки или микрошприцы:

- в точке А: 20 мкл очищенного экстракта образца, полученного в 7.4.2;
- в точке В: 20 мкл стандартного раствора афлатоксина B_1 (см. 4.14);
- в точке С: 10 мкл стандартного раствора афлатоксина B_1 (см. 4.14);
- в точке D: 20 мкл стандартного раствора афлатоксина B_1 (см. 4.14);
- в точке Е: 40 мкл стандартного раствора афлатоксина B_1 (см. 4.14).

Высушивают в медленном токе воздуха или инертного газа (см. 4.12). Диаметр полученных пятен должен быть 5 мм.

7.5.2.2 Проявка (см. Рисунок 1)

Проявляют хроматограмму в направлении I в темноте, используя проявляющий растворитель (см. 4.6.3) (слой в 1 см в насыщенной камере) до тех пор, пока линия фронта растворителя не достигнет линии границы. Вынимают пластину из камеры и позволяют высохнуть в темноте при температуре окружающей среды в течение не менее 15 минут.

Затем проявляют хроматограмму в направлении II в темноте, используя проявляющий растворитель (см. 4.6.1) (слой в 1 см в ненасыщенной камере) до тех пор, пока линия фронта растворителя не достигнет линии границы. Вынимают пластину из камеры и дают высохнуть в темноте при температуре окружающей среды.

Размеры в миллиметрах

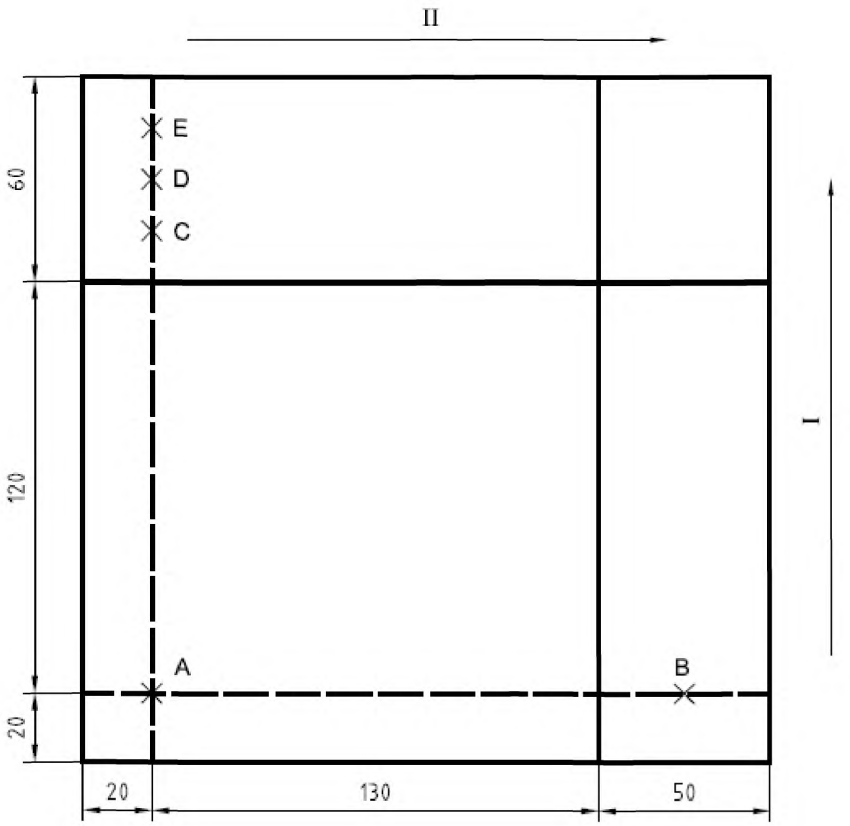

Рисунок 1 – Нанесение растворов

7.5.2.3 Интерпретация хроматограммы (см. Рисунок 2)

Изучают хроматограмму в ультрафиолетовом свете, поместив пластину в 10 см от лампы (см. 5.8). Определяют позицию пятен голубого свечения B, C, D и E афлатоксина B_1 из стандартного раствора и проводят две воображаемые линии, проходящие через эти пятна и под прямым углом к направлению проявки. Точка P пересечения этих линий служит местом, в котором следует ожидать пятна афлатоксина B_1 , происходящего из экстракта испытуемой пробы, нанесенной в точке A (см. Рисунок 1). Однако действительной точкой пятна афлатоксина B_1 может быть точка Q в пересечении двух воображаемых прямых линий, формирующих угол в 100° между ними и проходящих через точки B и C соответственно.

Размеры в миллиметрах

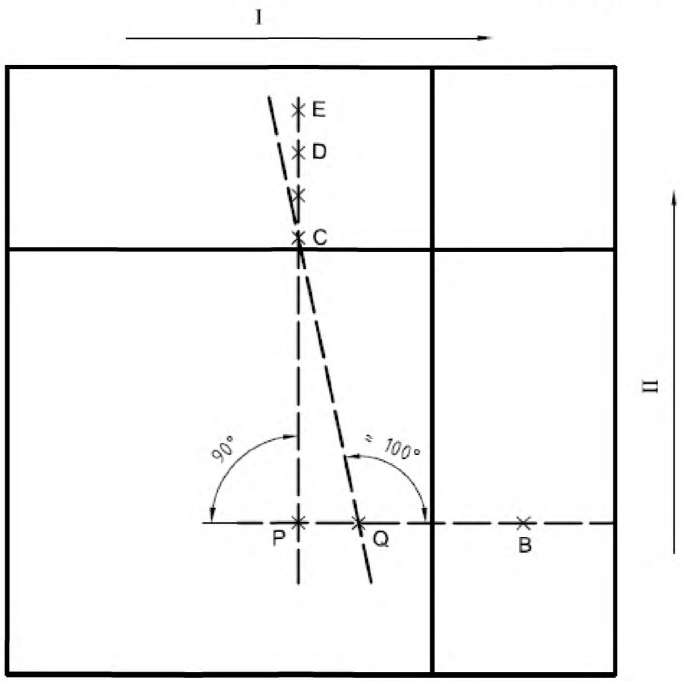

Рисунок 2 – Интерпретация хроматограммы

7.5.2.4 Дополнительная хроматография

Прочерчивают на новой пластине (см. 5.7) две прямые линии, параллельные двум смежным сторонам, как показано на рис.1, и наносят в точке А 20 мкл очищенного экстракта испытуемой пробы, полученной в 7.4.2, и нанесением сверху него 20 мкл стандартного раствора афлатоксина B_1 (см. 4.14). Проявляют по 7.5.2.2. Осматривают хроматограмму в ультрафиолетовом свете и удостоверяются, что:

- пятна афлатоксина B_1 из экстракта и стандартный раствор налагаются один на другой;
- свечение этого пятна более интенсивно, чем свечение пятна афлатоксина B_1, проявленного в точке Q на первой пластине.

7.6 Определение

7.6.1 Визуальное измерение

7.6.1.1 Метод А

Определяют количество афлатоксина B_1 в экстракте путем сравнения интенсивности свечения пятен экстракта со свечением пятен стандартного раствора. Интерполируют при необходимости.

Свечение, получаемое путем нанесения экстракта на стандартный раствор, должно быть более интенсивным, чем свечение 10 мкл экстракта, и восприниматься, как только одно пятно. Если интенсивность свечения, даваемого 10 мкл экстракта, больше, чем свечение 40 мкл стандартного раствора, разбавляют экстракт в 10 или 100 раз хлороформом (см. 4.1) или смесью бензола/ацетонитрила (см. 4.4) перед повторением тонкослойной хроматографии.

7.6.1.2 Метод В

Определяют количество афлатоксина B_1 в экстракте путем сравнения интенсивности пятна экстракта с интенсивностью пятен С, D и Е из стандартного раствора. Интерполируют при необходимости.

Если интенсивность свечения, даваемого 20 мкл экстракта, больше, чем свечение 40 мкл стандартного раствора, разбавляют экстракт в 10 или 100 раз хлороформом (см. 4.1) или смесью бензола/ацетонитрила (см. 4.4) перед повторением тонкослойной хроматографии.

7.6.2 Измерение фтороденситометрии

Измеряют интенсивность свечения пятен афлатоксина B_1 фтороденситометром (см. 5.10) при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны излучения 443 нм.

Определяют, в случае метода А, количество афлатоксина B_1 в пятнах экстракта путем сравнения с интенсивностью свечения пятен из стандартного раствора и, в случае метода В, количество афлатоксина B_1 в пятне экстракта путем сравнения с интенсивностью свечения пятен С, D и Е из стандартного раствора.

7.7 Подтверждение идентичности афлатоксина B_1

7.7.1 Общие положения

Подтверждают идентичность афлатоксина B_1 в экстракте предварительным испытанием серной кислотой (см. 7.7.2) и, если результаты этого испытания положительные, окончательным подтверждающим испытанием (см. 7.7.3). Если результат предварительного испытания серной кислотой отрицательный, нет необходимости проводить окончательное подтверждение, поскольку в этом случае афлатоксин B_1 отсутствует.

7.7.2 Предварительное испытание серной кислотой

Распыляют серную кислоту (см. 4.13) на хроматограмму, полученную в 7.5.1 или 7.5.2. Свечение пятен афлатоксина B_1 должно стать из голубого желтым в ультрафиолетовом свете.

7.7.3 Подтверждающее испытание

7.7.3.1 Образование афлатоксина B_1-гемиацеталя (афлатоксин B_2)

В случае с простыми и лишь слегка пигментированными кормами используют метод одномерной тонкослойной хроматографии, по 7.7.3.2. В случае с простыми пигментированными кормами, комбикормами или при сомнениях используют метод двухмерной тонкослойной хроматографии, по 7.7.3.3.

7.7.3.2 Одномерная тонкослойная хроматография

Прочерчивают прямую линию на пластине (см. 5.7), поделив ее на две равные части. Наносят на каждую часть в 20 мм от нижнего края и с интервалами 15 мм указанные ниже объемы стандартного раствора афлатоксина B_1 и экстракта:

- 25 мкл стандартного раствора афлатоксина B_1 (см. 4.14);
- объем экстракта, полученного в 7.4.2, содержащего 2,5 нг афлатоксина B_1;
- 25 мкл стандартного раствора афлатоксина B_1 (см. 4.14) и, нанесением на него, объем экстракта, полученного в 7.4.2, содержащего 2,5 нг афлатоксина B_1.

Наносят на одну из двух половинок пластины, нанесением на пятна, которые были нанесены до этого, 1-2 мкл трифторуксусной кислоты (см. 4.11). Высушивают в токе воздуха при температуре окружающей среды.

Проявлять хроматограмму необходимо в темноте, используя один из проявляющих растворителей (см. 4.6). Выбор растворителя должен быть сделан заранее. Система растворителей должна обеспечивать четкое отделение афлатоксина B_1-гемиацеталя (афлатоксина B_2) от интерферирующих веществ. Линия фронта растворителя должна двигаться около 120 мм.

Позволяют растворителям испариться в темноте и затем распыляют серную кислоту (см. 4.13) на ту часть пластину, которая до этого не была обработана трифторуксусной кислотой. Осматривают пластину под ультрафиолетом.

Идентичность афлатоксина B_1 подтверждена, если:

a) значение R_f производного афлатоксина B_1, из экстракта, соответствует такому же значению от стандартного раствора;

b) производное афлатоксина B_1, происходящего из стандартного раствора, нанесенного поверх экстракта, имеет более интенсивное свечение, чем производное афлатоксина B_1, из экстракта.

Поскольку пятна свечения от экстракта, имеющие такое же значение R_f, что и афлатоксин B_1-гемиацеталь, могут привести к ошибочной положительной интерпретации хроматограммы, их присутствие должно быть проверено на той части пластины, что обрабатывалась серной кислотой.

В сомнительных случаях следует использовать подтверждение двухмерной тонкослойной хроматографией (см. 7.7.3.3).

7.7.3.3 Двухмерная тонкослойная хроматография

7.7.3.3.1 Нанесение растворов

Прочерчивают две прямые линии на пластине (см. 5.7), параллельно двум смежным сторонам (60 мм от каждой стороны), чтобы установить границы движения линий фронта растворителей. Наносят следующие растворители на пластину, используя капиллярные пипетки или микрошприцы:

- в точке A: объем очищенного экстракта из образца, полученного в 7.4.2, содержащего около 2,5 нг афлатоксина B_1, и каплю (1-2 мкл) трифторуксусной кислоты (см. 4.11);
- в точках B и C: 25 мкл стандартного раствора афлатоксина B_1 (см. 4.14) и каплю трифторуксусной кислоты (см. 4.11).

Высушивают в токе воздуха при температуре окружающей среды.

7.7.3.3.2 Проявка

Проявляют хроматограмму в направлении I (см. Рисунок 3) в темноте, используя проявляющий растворитель (см. 4.6.2) (слой в 1 см в ненасыщенной камере) до тех пор, пока линия фронта растворителя не достигнет линии границы. Вынимают пластину из камеры и дают высохнуть в темноте при температуре окружающей среды в течение 5 минут.

Затем проявляют хроматограмму в направлении II в темноте, используя проявляющий растворитель (см. 4.6.1) (слой в 1 см в ненасыщенной камере) до тех пор, пока передняя линия растворителя не достигнет линии границы. Вынимают пластину из камеры и дают высохнуть при температуре окружающей среды.

7.7.3.3.3 Интерпретация хроматограммы

Изучают хроматограмму в ультрафиолетовом свете от лампы (см. 5.8) и проверяют следующие признаки:

a) появление голубого свечения пятна афлатоксина B_1-гемиацеталя и иногда слабо-голубого свечения пятна афлатоксина B_1, который не вступил в реакцию с трифторуксусной кислотой, из стандартного раствора, нанесенного в точке C (движение в направлении I) и от стандартного раствора, нанесенного в точке B (движение в направлении II).

b) появление пятен, схожих с теми, что описаны в a), из экстракта образца, нанесенного в точке A. Позиция этих пятен определяется теми пятнами, что происходят из стандартного раствора, нанесенного в точках B и C. Интенсивность свечения пятен афлатоксина B_1-гемиацеталя, из экстракта и из стандартного раствора, нанесенного в точках B и C, должна быть сопоставима.

Размеры в миллиметрах

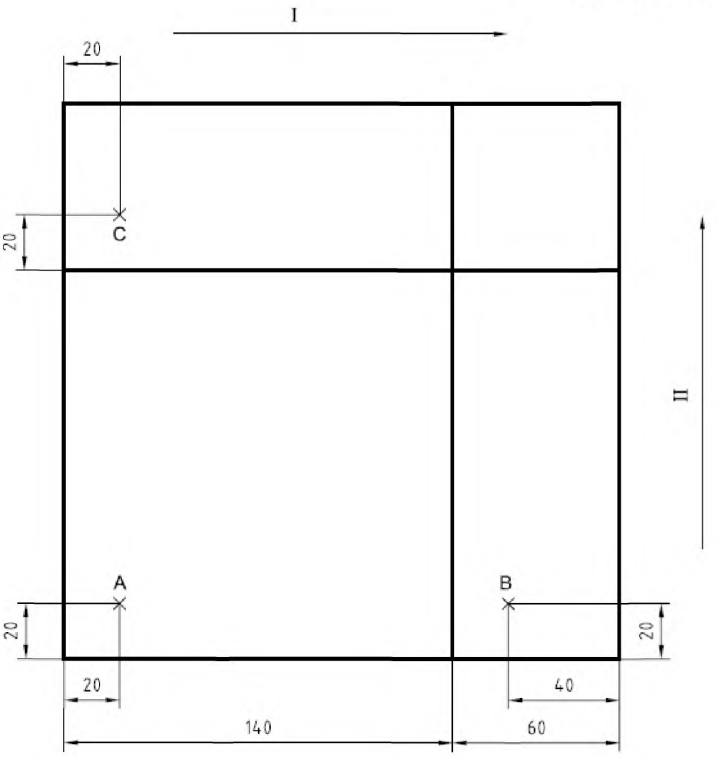

Рисунок 3 – Испытание на подтверждение

7.8 Количество определений

Выполняют два определения из одного и того же испытуемого образца.

8 Выражение результатов и расчеты

8.1 Визуальные измерения

Содержание афлатоксина B_1, выраженное в микрограммах на килограмм образца, вычисляют по Формуле:

$$\frac{C \times V_1 \times V_3}{m \times V_2}, \qquad (3)$$

где C – концентрация в микрограммах афлатоксина B_1 на миллилитр стандартного раствора (4.14) (приблизительно 0,1 мкг/мл);

m – масса испытуемой пробы в граммах, соответствующая объему экстракта, подвергнутого колоночной очистке (10,0 г);

V_1 – окончательный объем экстракта в микролитрах, с учетом всех разбавлений, которые оказались необходимы;

V_2 и V_3 – соответственно, объемы, в микролитрах, экстракта и стандартного раствора афлатоксина B_1 (см. 4.14), нанесенных на пластину, имеющих одинаковую интенсивность свечения.

8.2 Фтороденситометрические измерения

Содержание афлатоксина B_1, выраженное в микрограммах на килограмм образца, вычисляют по Формуле:

$$\frac{m_1 \times V_1}{m \times V_2}, \quad (4)$$

где m – масса испытуемой пробы в граммах, соответствующая объему экстракта, подвергнутого колоночной очистке (10,0 г);

m_1 – масса, в нанограммах, афлатоксина B_1 в пятне экстракта (с учетом объема V_2), вычисленная из измерений;

V_1 – окончательный объем экстракта в микролитрах, с учетом всех разбавлений, которые оказались необходимы;

V_2 – объем, в микролитрах, экстракта, нанесенного на пластину (10-20 мкл).

9 Межлабораторные испытания

Подробности межлабораторных испытаний на точность метода обобщены в Приложении А. Полученные в этом межлабораторном испытании значения не могут применяться к другим диапазонам концентрации и матрицам, чем указанные.

10 Отчет об испытании

Отчет об испытании должен указывать:

- любую информацию, необходимую для полной идентификации образца;
- примененный метод отбора проб, если известен;
- примененный метод испытания (А или В) со ссылкой на настоящий международный стандарт;
- метод определения (визуальный или фтороденситометрический);
- все рабочие детали, не установленные в настоящем стандарте, или рассматриваемые как альтернативные, вместе с подробным описанием любых происшествий и случаев, которые могли оказать вероятное влияние на результат(ы);
- полученный результат(ы) испытания.

Приложение А
(информационное)

Результаты межлабораторных испытаний

Три межлабораторных испытания, два из которых выполнялись на международном уровне (№ 1 и № 2), на комбикормах (метод В) дали результаты, указанные в Таблице А.1.

11 лабораторий, участвовавших в испытании 2, также анализировали образец по методу А, что позволял его состав, и получили результаты, очень схожие с теми, что были получены при применении метода В, способом визуального или фтороденситометрического измерения.

Таблица А.1

Параметр	Испытание		
	1	2	3
Число лабораторий	23	11	13
Среднее, мкг/кг	162,7	25,4	13,4
Стандартное отклонение повторяемости (сходимости) (s_r), мкг /кг	16,9	2,7	1,7
Коэффициент вариации повторяемости (сходимости), %	10	11	13
Предел повторяемости (сходимости) (2,83 s_r), мкг/кг	47,8	7,6	4,8
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг /кг	45,2	6,8	4,0
Коэффициент вариации воспроизводимости, %	28	27	30
Предел воспроизводимости (2,83 s_R), мкг /кг	128,0	19,2	11,3

Приложение Д.А
(информационное)

Сведения о соответствии государственных, межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам

Сведения о соответствии государственных, межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам, приведены в Таблице Д.А.1.

Таблица Д.А.1

Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование государственных, межгосударственных стандартов
ISO 6498:1998 Корма для животных. Подготовка проб для испытания	IDT	СТ РК ИСО 6498-2008 Корма для животных. Подготовка испытуемых проб

УДК 636. 085 **МКС 65.120**

Ключевые слова: корма для животных, определение афлатоксина B_1, простые корма комбикорма

Басуға _____ж. қол қойылды. Пішімі 60х84 1/16 Қағазы офсеттік.
Қаріп түрі «Times New Roman»
Шартты баспа табағы 1,86. Таралымы ____ дана.
Тапсырыс ____ _____
«Қазақстан стандарттау және сертификаттау институты» республикалық мемлекеттік кәсіпорны
010000, Астана қаласы Орынбор көшесі, 11 үй
«Эталон орталығы» ғимараты
Тел.: 8(7172) 240074, 793324

gost.e-ecolog.ru