ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ЗЕРНО И ЗЕРНОПРОДУКТЫ

Определение дезоксиниваленола (вомитоксина) хроматографическим методом

СТ РК 1988-2010

Издание официальное

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

Астана

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и сертификации» Комитета технического регулирования и метрологии и ТК по стандартизации № 71 в области экологическ безопасности «Объекты окружающей среды. Промышленные отходы».

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Председателя Комитета технического регулирования и метрологии Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан от 08 октября 2010 г. № 443-од.

3 В настоящем стандарте реализованы положения Закона Республики Казахстан «О техническом регулировании» от 09 ноября 2004 года. № 603-II с учетом требований ГОСТ Р 51116-97 «Комбикорма, зерно, продукты его переработки. Метод определения содержания дезоксиниваленола (вомитоксина)», Методических указаний по обнаружению, идентификации и определению содержания дезоксиниваленола (вомитоксина) и зеараленона в зерне и зернопродуктах, № 5177-90 от 27 июня 1990 г., Методических указаний по обнаружению, идентификации и определению содержания дезоксиниваленола (вомитоксина) и зеараленона в зерне и зернопродуктах (№ 3940-85) № 4.05.019.97.

4 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ 2015 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

Содержание

1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Сущность метода	2
4 Аппаратура, материалы и реактивы	2
5 Подготовка к испытанию	4
6 Подготовка к ВЭЖХ-испытаниям	5
7 Подготовка к ТСХ-испытаниям	7
8 Порядок проведения ВЭЖХ-испытаний	7
9 Порядок проведения ТСХ-испытаний	9
10 Контроль точности измерений	10
Приложение А (информационное)	12
Приложение Б (информационное)	13

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ЗЕРНО И ЗЕРНОПРОДУКТЫ

Определение дезоксиниваленола (вомитоксина) хроматографическим методом

Дата введения 2011-07-01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на зерно, продукты его переработки и устанавливает определение содержания дезоксиниваленола (вомитоксина):

- метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее ВЭЖХ) с использованием жидкостного хроматографа. Предел определения в пробе от 0,05 мг/кг до 4,0 мг/кг, в растворе от 1 нг/мкдм^3 до 20 нг/мкдм^3;
- метод тонкослойной хроматографии (далее ТСХ). Предел определения в пробе 0,2 мг/кг.

Требования к контролируемому показателю установлены в РК 4.01.071.03.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные нормативные документы:

СТ РК ИСО 13690-2006 Зерновые, бобовые и продукты их переработки. Отбор проб неподвижных партий.

СТ РК ГОСТ Р 50436-2003 Зерновые. Отбор проб зерна.

ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия.

ГОСТ 2603-79 Реактивы. Ацетон. Технические условия.

ГОСТ 3759-75 Реактивы. Алюминий хлористый 6-водный. Технические условия.

ГОСТ 5556-81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия.

ГОСТ 5962-67 Спирт этиловый ректификованный. Технические условия.

ГОСТ 13586.3-83 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб.

ГОСТ 22300-76 Реактивы. Эфиры этиловый и бутиловый уксусной кислоты. Технические условия.

ГОСТ 24104-2001 Весы лабораторные. Общие технические требования.

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.

ГОСТ 26312.1-84 Крупа. Правила приемки и методы отбора проб.

ГОСТ 27668-88 Мука и отруби. Приемка и методы отбора проб.

ГОСТ 28498-90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний.

ГОСТ 29230-91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные.

ГОСТ ИСО 5725-1-2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Основные положения и определения.

Издание официальное

ГОСТ ИСО 5725-2-2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений.

РК 4.01.071.03 Санитарные правила и номы «Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» от 11 июня 2003г.

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 затрагивающий эту ссылку.

3 Сущность метода

Сущность метода заключается в экстракции дезоксиниваленола (вомитоксина) из испытуемой пробы смесью ацетонитрила с водой, очистке экстракта на двух последовательных колонках с активированным углем и количественном определении дезоксиниваленола (вомитоксина) с помощью жидкостного хроматографа со спектрофотометрическим детектором на ультрафиолетовую область (далее с УФ-детектором) в двухволновом режиме.

4 Аппаратура, материалы и реактивы

4.1 Реактивы

- государственный стандартный образец (далее ГСО) дезоксиниваленола в этилацетате по действующей нормативной документации;
- ацетонитрил для хроматографии с содержанием основного вещества не менее 99,5 % (оптическая плотность ацетонитрила при длине волны 210 нм относительно воды должна быть не более 0,3 е.о.п.);
- ацетон, ч.д.а. по ГОСТ 2603;
- гексан, ч. или гептан, ч.д.а.;
- изопропиловый спирт (пропанол-2), х.ч.;
- спирт этиловый ректификат по ГОСТ 5962;
- этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), ч.д.а. по ГОСТ 22300;
- эфир диэтиловый по действующей нормативной документации;
- алюминий оксид нейтральный для хроматографии по Брокману 11 для колоночной хроматографии, или алюминий оксид для хроматографии;
- алюминий хлористый, 6-водный, ч.д.а. по ГОСТ 3759;
- силикагель L для колоночной хроматографии с размером частиц от 100 мкм до 160 мкм;
- уголь активированный марки ФАС размером частиц от 0,08 мм до 0,10 мм;
- вода бидистиллированная, перегнанная в присутствии серной кислоты (0,5 $см^3$ серной кислоты плотностью 1,84 $г/см^3$ на 1 $дм^3$ дистиллированной воды) или деионизированная.

4.2 Приборы и оборудование

- весы аналитические специального класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г с наибольшим пределом допускаемой абсолютной погрешности ± 0,001 г по ГОСТ 24104;
- весы лабораторные высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г по ГОСТ 24104;

- мельница лабораторная электрическая, обеспечивающая измельчение пробы до прохода без остатка через сито с отверстиями диаметром 1 мм;
- аппарат для встряхивания проб, обеспечивающий частоту встряхивания 200 колебаний в минуту;
- хроматограф жидкостный с УФ-детектором со спектральным диапазоном от 190 нм до 360 нм, обеспечивающий одновременное измерение на не менее двух длинах волн, уровень шумов не более 10^{-4} единиц оптической плотности (е.о.п.);
- спектрофотометр типа СФ-26, СФ-46 со спектральным диапазоном от 186 нм до 1100 нм, основная погрешность измерений коэффициента пропускания не более 1 %, градуировки длин волн в УФ области - не более 0,1 нм;
- колонка аналитическая хроматографическая для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) размером 80 мм × 2 мм, заполненная сорбентом диабонд С 16 с эффективностью не ниже 5000 теоретических тарелок (далее - т. т.);
- колонки хроматографические для жидкостной хроматографии (ЖХ) размером 100х5 мм с оттянутым концом и шарообразной верхней частью вместимостью 25 $см^3$;
- колонка стеклянная хроматографическая 220 мм × 15 мм;
- сито с отверстиями диаметром 1 мм.
- испаритель ротационный с ловушкой марки ИР-2М или насос водоструйный лабораторный по ГОСТ 25336;
- термометр лабораторный с пределами от 2 °С до 105 °С с ценой деления 1 °С ГОСТ 28498;
- микрошприцы МШ-10 на 10; 25 $мкдм^3$ для ВЭЖХ;
- стеклянные камеры для ТСХ с притертыми крышками;
- облучатель настольный ультрафиолетовый, снабженный светофильтром с максимумом пропускания при длине волны 365 нм;
- шкаф сушильный, обеспечивающий нагрев до 150 °С;
- воронки делительные ВД 2-250 или ВД 2-500 по ГОСТ 25336;
- колбы вместимостью 25; 50 $см^3$ ТС по ГОСТ 25336;
- колбы плоскодонные конические вместимостью 250; 500 $см^3$ с притертыми стеклянными или полиэтиленовыми пробками по ГОСТ 25336;
- колбы грушевидные вместимостью 10; 20; 100 $см^3$ по 25336;
- колбы мерные вместимостью 25; 50; 100 $см^3$ по ГОСТ 1770;
- пробирки типа П1 по ГОСТ 25336;
- пипетки градуированные по ГОСТ 29230;
- цилиндры мерные вместимостью 25; 100; 250 $см^3$ с притертой пробкой по ГОСТ 1770;
- склянки из темного стекла с притертыми пробками.

4.3 Материалы

- баллон с азотом;
- вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556;
- пластинки для ТСХ размером 15 мм × 15 мм или 20 см × 20 см;
- фильтры бумажные обеззоленные марки ФОМ.

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Допускается использовать аппаратуру, мерную посуду, реактивы имеющие аналогичные метрологические характеристики или выше.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Применяемые средства измерений подлежат испытаниям с целью утверждения типа или метрологической аттестации, поверке средств измерений и внесению в реестр в Республике Казахстан в соответствии с законодательством в области обеспечения единства измерений.

5 Подготовка к испытанию

5.1 Отбор проб по СТ РК ИСО 13690, СТ РК ГОСТ Р 50436, ГОСТ 13586.3, ГОСТ 26312.1, ГОСТ 27668.

Масса средней пробы исследуемого продукта должна быть не менее 2 кг.

При отборе проб из данной партии продукта основной задачей является получение среднего образца или средней пробы, представительных по концентрации микотоксинов для всей партии (отобранные образцы должны характеризовать качество всей партии).

5.2 Подготовка пробы к испытанию

Из средней пробы исследуемого продукта методом квартования выделяют часть пробы массой не менее 100 г и измельчают на лабораторной мельнице до такого состояния, чтобы она проходила без остатка через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Выделенную часть размолотой пробы тщательно перемешивают.

Выделенную часть пробы муки используют для анализа без предварительного размалывания.

5.3 Экстракция дезоксиниваленола (вомитоксина, см. Приложение А) из исследуемого продукта

Навеску исследуемого продукта массой (25 ± 0,05) г помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 500 $см^3$, приливают 20 $см^3$ бидистиллированной воды и затем 105 $см^3$ ацетонитрила. Колбу закрывают пробкой и встряхивают на аппарате для встряхивания проб в течение 30 мин. После этого содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр в колбу с притертой пробкой.

5.4 Приготовление элюирующих растворов

Приготавливают смеси ацетонитрила и воды в объемных соотношениях: 0,05:1; 0,125:1; 0,5:1; 1:1.

5.5 Приготовление исходного раствора дезоксиниваленола (вомитоксина)

Аттестованная смесь разводится в соответствие с прилагаемой инструкцией на ГСО до концентрации 100 $мг/дм^3$ (100 $нг/мкдм^3$).

Навеску кристаллического дезоксиниваленола (вомитоксина) массой (10 ± 0,01) мг помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$, растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем раствора бидистиллированной водой до метки.

Для определения массовой концентрации дезоксиниваленола (вомитоксина) в исходном растворе 3 $см^3$ исходного раствора переносят в пробирку. Растворитель испаряют в токе азота или при вакууме с помощью водоструйного насоса при нагревании не выше 60° С досуха. К остатку добавляют 3 $см^3$ метилового спирта и измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 218 нм в кюветах толщиной просвечиваемого слоя 10 мм относительно метилового спирта.

Массовую концентрацию дезоксиниваленола (вомитоксина) в исходном растворе $с_и$, $нг/мкдм^3$, вычисляют по Формуле (1):

$$с_и = \frac{D \cdot 296 \cdot 10^9}{4500 \cdot 10^6}, \quad (1)$$

где D - оптическая плотность исходного раствора дезоксиниваленола (вомитоксина), е.о.п.;

296 - молекулярная масса дезоксиниваленола (вомитоксина), г;

4500 - коэффициент молярной экстинкции дезоксиниваленола (вомитоксина), $дм^3/моль \cdot см$;

10^9 - коэффициент пересчета г в нг;

10^6 - коэффициент пересчета $дм^3$ в $мкдм^3$.

5.6 Приготовление градуировочных растворов дезоксиниваленола (вомитоксина)

В мерные колбы вместимостью 100 $см^3$ переносят исходный раствор дезоксиниваленола (вомитоксина) в объемах, указанных в Таблице 1. Объем жидкости в колбах доводят до метки дистиллированной водой.

Градуировочные растворы хранят в стеклянной посуде с притертой пробкой в темном месте при температуре около 0 °С не более года.

Таблица 1 - Растворы для установления градуировочной характеристики при определении концентрации дезоксиниваленола

Номер колбы	Объем исходного раствора дезоксиниваленола, $см^3$	Массовая концентрация дезоксиниваленола в градуировочном растворе, c_i (i=1, 2, 3), $нг/мкдм^3$	Масса дезоксиниваленола, вводимая в хроматограф с градуировочным раствором, m_i (i=1, 2, 3), нг
1	5	$\tilde{n}_1 = \frac{\tilde{n}_è \cdot 5}{100}$	$4c_1$
2	10	$\tilde{n}_2 = \frac{\tilde{n}_è \cdot 10}{100}$	$4c_2$
3	25	$\tilde{n}_3 = \frac{\tilde{n}_è \cdot 25}{100}$	$4c_3$

6 Подготовка к ВЭЖХ-испытаниям

6.1 Подготовка колонок для жидкостной хроматографии (далее ЖХ) для очистки экстракта

На дно двух хроматографических колонок (ЖХ) помещают промытые ацетонитрилом ватные тампоны. В одну колонку вносят (0,2 ± 0,05) г (далее колонка 1), в другую (0,1 ± 0,05) г (далее колонка 2) активированного угля. Уплотняют при осторожном постукивании до высоты слоя, не изменяющейся при дальнейшем постукивании.

6.2 Кондиционирование ВЭЖХ колонки

Перед первыми анализами колонку кондиционируют, проводят 3 – 4 холостых опыта, т.е. проводят градиентное элюирование по 8.1 без введения в колонку пробы.

6.3 Очистка экстракта

5 $см^3$ фильтрата (5.3) переносят в колонку 1 (ЖХ) (6.1) и элюируют в остродонную колбу вместимостью 50 $см^3$ со скоростью не более 0,5 $см^3$/мин. С целью ускорения элюирование можно проводить с помощью вакуума водоструйного насоса. Не допуская осушения сорбента, через колонку пропускают 15 $см^3$ ацетонитрила, собирая элюат в ту же остродонную колбу.

По окончании элюирования из колбы с помощью ротационного вакуумного испарителя при температуре не более 60 °С полностью отгоняют растворитель. К сухому остатку добавляют 1 $см^3$ бидистиллированной воды. Колбу закрывают пробкой и ее стенки осторожно споласкивают находящейся в ней жидкостью. Содержимое колбы с помощью пипетки переносят в колонку 2 (6.1). Стенки колбы повторно обмывают 1 $см^3$ бидистиллированной воды, которую также переносят в колонку 2. Колонку 2 промывают 2 $см^3$ бидистиллированной воды и элюат отбрасывают.

Из колонки 2 дезоксиниваленол элюируют 7,5 $см^3$ ацетонитрила в остродонную колбу вместимостью 25 $см^3$. Собранный элюат упаривают досуха с помощью ротационного вакуумного испарителя. Остаток растворяют в 0,2 $см^3$ метилового спирта. Полученный раствор используют для хроматографического анализа (далее - испытуемый

раствор).

6.4 Градуировка прибора

Для градуировки прибора в колонку (ВЭЖХ) вводят по 4 мкдм^3 градуировочных растворов и проводят хроматографирование по 8.1. Каждый градуировочный раствор вводят 3 раза. Для каждого пика определяют время удерживания (t_i, мин), измеряют высоту пика (h_i, мм) или е.о.п.

По полученным результатам устанавливают время удерживания дезоксиниваленола (вомитоксина) и погрешность времени удерживания. Среднее время удерживания $\bar{t}$, мин, вычисляют по Формуле (2):

$$\bar{t} = \frac{\sum_{i=1}^{n} t_i}{n}, \qquad (2)$$

где t_i – время удерживания для i-го градуировочного раствора, мин;

n – количество введенных в хроматограф градуировочных растворов (n=9).

Среднее квадратическое отклонение значения времени удерживания S, мин, вычисляют по Формуле (3):

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(t_i - \bar{t})^2}{n-1}}, \qquad (3)$$

Границы абсолютной погрешности значения времени удерживания ± Δ_t, мин, вычисляют по Формуле (4):

$$\Delta_t = S \cdot t, \qquad (4)$$

где t - критерий Стьюдента для числа степеней свободы f= n - 1 (P = 0,95). Записывают интервал, в котором могут находиться с вероятностью P = 0,95 значения времени удерживания дезоксиниваленола (вомитоксина) от ($\bar{t}$ - Δ_t) до ($\bar{t}$ + Δ_t).

По результатам хроматографирования градуировочных растворов определяют значение градуировочного коэффициента. Для этого сначала вычисляют для каждого градуировочного раствора значение градуировочного коэффициента K_i, нг/мм или нг/е.о.п., по Формуле (5):

$$K_i = \frac{m_i}{h_i}, \qquad (5)$$

где m_i - масса дезоксиниваленола (вомитоксина), введенная в хроматограф с i-ым градуировочным раствором, нг (по данным Таблицы 1);

h_i - высота пика i-го градуировочного раствора, мм или е.о.п.

Среднее арифметическое значение градуировочного коэффициента, $\bar{E}$, нг/мм или нг/е.о.п., вычисляют по Формуле (6):

$$\bar{K} = \frac{\sum_{i=1}^{n} K_i}{n}, \qquad (6)$$

где n - количество градуировочных растворов, введенных в хроматограф (n = 9).

Значение градуировочного коэффициента контролируют не реже одного раза в месяц. Для этого вводят в хроматограф один из градуировочных растворов и вычисляют для него градуировочный коэффициент K_i. Если при этом $\left|K_i - \overline{K}\right| \le 0{,}1 \cdot \overline{K}$, прибор не подлежит переградуировке. В противном случае прибор должен быть отградуирован заново согласно 6.4.

7 Подготовка к ТСХ-испытаниям

7.1 Очистка экстракта

В стеклянную хроматографическую колонку на дно помещают кусочек ваты, насыпают 0,75 г порошка активированного угля и сверху - слой оксида алюминия 0,75 г. Над слоем алюминия помещают кусочек ваты. Осторожно помещают в колонку 25 $см^3$ экстракта, соответствующие 5 г исходного образца (при анализе кукурузы наливают 15 $см^3$ экстракта, соответствующие 3 г исходного образца). Отбирают элюат и, не давая колонке просохнуть, добавляют еще 10 $см^3$ смеси ацетонитрил-вода (84:16).

Объединенные элюаты фильтруют через бумажный складчатый фильтр в грушевидную колбу на 50 $см^3$, бумажный фильтр промывают от 5 $см^3$ до 10 $см^3$ изопропилового спирта в ту же колбу и фильтрат упаривают на ротационном испарителе до объема от 5 $см^3$ до 7 $см^3$. Добавляют около 20 $см^3$ изопропилового спирта и повторно упаривают на ротационном испарителе досуха. Остаток в колбе после упаривания не должен содержать капель воды. Остаток растворяют в 200 $мкдм^3$ этилацетата и плотно закрывают стеклянной пробкой - раствор А.

8 Порядок проведения ВЭЖХ-испытаний

8.1 Выполнение измерений

8.1.1 Условия проведения измерений

Измерения проводят в следующих условиях:

а) разделение компонентов проводят на колонке размером 80мм × 2 мм;

б) сорбент - диабонд С 16 с эффективностью не менее 5000 т.т.;

в) рабочие длины волн УФ-детектора - 230 нм и 276 нм (230 нм - опорная длина волны, 276 нм - длина волны для контроля чистоты экстракта);

г) скорость элюирования - 100 $мкдм^3$/мин.

Элюирование проводят в градиентном режиме. Для этого в шприце насоса готовят элюент с перформированным градиентом. Насос устанавливают в перевернутое положение и набирают последовательно:

- 600 $мкдм^3$ воды;
- 500 $мкдм^3$ раствора ацетонитрил-вода (0,05:1);
- 600 $мкдм^3$ раствора ацетонитрил-вода (0,125:1);
- 100 $мкдм^3$ раствора ацетонитрил-вода (0,5:1);
- 100 $мкдм^3$ раствора ацетонитрил-вода (1:1);
- 700 $мкдм^3$ ацетонитрила;

д) объем анализируемого раствора - 4 $мкдм^3$;

е) чувствительность - 0,1 е.о.п. при 100 милливольтах шкалы самописца.

На приборе устанавливают следующие параметры:

количество образцов - 3;

объем ступеней, $мкдм^3$: 1-600, 2-500, 3-600, 4-100, 5-100, 6-700;

объем регенерации, $мкдм^3$ - 200, буфера - 15, пробы - 4, буфера - 10;

расход элюента - 100 мкдм^3/мин; скорость набора - 800 мкдм^3/мин.

8.1.2 Проведение измерений испытуемого раствора

Допускается проведение анализа методом внешнего стандарта.

Если прибор предварительно отградуирован по 6.4, в колонку хроматографа вводят три раза по 4 мкдм^3 испытуемого раствора, полученного по 6.3. По показаниям прибора при двух длинах волны - 230 нм и 276 нм оценивают чистоту испытуемого раствора согласно инструкции к прибору. Идентификацию пика дезоксиниваленола (вомитоксина) проводят по времени удерживания (t), которое должно находиться в интервале, установленном при градуировке: $(\bar{t} - \Delta_t) \le t \le (\bar{t} + \Delta_t)$. Измеряют высоту пиков дезоксиниваленола (вомитоксина).

Если прибор предварительно не градуировали, в колонку хроматографа вводят три раза по 4 мкдм^3 испытуемого раствора и градуировочных растворов. Измеряют высоту пиков дезоксиниваленола (вомитоксина) испытуемого раствора и того градуировочного раствора, высота пиков которого наименее отличается от высоты пиков испытуемого раствора.

8.2 Обработка результатов

8.2.1 В том случае, когда одновременно с испытуемыми растворами хроматографируют и градуировочные растворы, массовую долю дезоксиниваленола (вомитоксина) X, нг/г, в испытуемой пробе вычисляют по Формуле (7):

$$X = \frac{m_i \cdot h_{îáð} \cdot 0{,}2 \cdot 125 \cdot 1000}{h_i \cdot 4 \cdot 25 \cdot 5 \cdot 87}, \qquad (7)$$

где m_i - масса дезоксиниваленола (вомитоксина), введенная в хроматограф с i-ым градуировочным раствором, высота пика которого наименее отличается от высоты пика испытуемого раствора, нг (определяется по данным Таблицы 1);

$h_{об р}$ - среднее арифметическое значение трех измерений высоты пиков испытуемого раствора, мм или е.о.п.;

h_i - среднее арифметическое значение трех измерений высоты пиков i-го градуировочного раствора, мм или е.о.п.;

0,2 - объем испытуемого раствора дезоксиниваленола (вомитоксина) из образца, см^3;

4 - объем испытуемого раствора, введенный в хроматограф, мкдм^3;

125 - объем экстракта испытуемой пробы, см^3;

5 - объем экстракта испытуемой пробы, взятый для очистки, см^3;

25 - масса навески испытуемой пробы, г;

87 - степень извлечения дезоксиниваленола (вомитоксина) из пробы, %;

1000 - коэффициент пересчета см^3 в мкдм^3.

8.2.2 Массовую долю дезоксиниваленола (вомитоксина) X, нг/г, в испытуемой пробе с использованием градуировочного коэффициента вычисляют по Формуле (8):

$$X = \frac{K \cdot h_{îáð} \cdot 0{,}2 \cdot 125 \cdot 1000}{4 \cdot 25 \cdot 5 \cdot 87} \qquad (8)$$

где К - градуировочный коэффициент, нг/мм или нг/е.о.п.

8.2.3 При анализе каждой испытуемой пробы выполняют два параллельных определения, начиная со взятия навески испытуемой пробы по 5.3.

Если расхождение между результатами параллельных определений не превышает $|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot r \cdot \overline{X}$, где$X_1$, X_2 и $\overline{O}$ - результаты первого и второго параллельных определений и их среднее арифметическое, соответственно, то среднее арифметическое X

принимают за результат анализа. В противном случае анализ повторяют. Значение норматива (r) приведено в Таблице 2.

По полученному результату анализа и значению относительной погрешности (σ, Таблица 2) рассчитывают абсолютную погрешность Δ, нг/г, по Формуле (9):

$$\Delta = 0{,}01 \cdot \sigma \cdot \overline{X}, \qquad (9)$$

Результат анализа представляют в виде: (X ± Δ) нг/г при P = 0,95. Числовое значение результата анализа и его погрешность должны оканчиваться цифрой одного и того же разряда.

Таблица 2 - Значение нормативов внутреннего оперативного контроля (ВОК) и характеристики погрешности анализа (для вероятности P = 0,95)

Диапазон массовой концентрации дезоксиниваленола, нг/г	Границы относительной погрешности ±σ	Значения норматива ВОК, %		
		повторяемости (r), n=2	воспроизводимости (R), m=2	точности (К)
от 0,2 до 20	25	24	36	36
св. 2,0 до 4,0	21	20	30	30

9 Порядок проведения ТСХ-испытаний

9.1 Обнаружение и количественное определение дезоксиниваленола с помощью одномерной ТСХ

На пластинке проводят тонкую карандашную линию в 1,5 см от нижнего края пластинки согласно Приложению Б, Рисунок 1.

На эту линию на расстоянии 2 см друг от друга наносят с помощью микрошприца 2, 5, 10 и 20 мкдм^3 раствора А. Между пятнами экстракта на расстоянии 1 см от них на ту же линию наносят 2, 4, 6 мкдм^3 стандартного раствора дезоксиниваленола (50, 100 и 150 нг дезоксиниваленола соответственно). Пластинку помещают в камеру для ТСХ и развивают в системе гексан-ацетон (3:2) на расстояние 15 см. Пластинку извлекают из камеры, сушат на воздухе от 3 мин до 4 мин и опрыскивают 10 % раствором хлористого алюминия в этаноле. Пластинку нагревают в сушильном шкафу в течение 5 мин при 105 °С, затем рассматривают в длинноволновом УФ-свете. Дезоксиниваленол проявляется в виде пятен с синей флуоресценцией с R_f от 0,25 до 0,30. Наличие в экстракте пятен, соответствующих по цвету флуоресценции и хроматографической подвижности стандарту дезоксиниваленола, свидетельствует о возможном наличии этого токсина в образце.

Для количественного определения сравнивают интенсивность флуоресценции разных количеств стандарта дезоксиниваленола с интенсивностью флуоресценции их пятен в образце, визуально оценивая количество нг токсинов в нанесенных на пластинку объемах раствора А.

Концентрацию дезоксиниваленола С, мг/кг, в образце рассчитывают по Формуле (10):

$$\tilde{N} = \frac{V_1 \cdot m}{V_2 \cdot M \cdot 1000}, \qquad (10)$$

где V_1 - объем раствора А в мкдм^3 (200 мкдм^3);

V_2 - объем раствора А, нанесенный на пластинку в мкдм^3;

m - масса дезоксиниваленола (в нг) V_2 мкдм^3 раствора А, оцененная визуальным

сравнением со стандартом на ТСХ-пластинке;

М - аликвотная навеска образца, соответствующая раствору А (5 г для пшеницы, 3 г для кукурузы).

Если интенсивность флуоресценции пятна дезоксиниваленола в экстракте выше интенсивности флуоресценции пятна дезоксиниваленола, соответствующего 6 мкдм^3 стандартного раствора, то следует разбавить раствор А этилацетатом, т.е. увеличить объем V_1, внеся соответствующие коррективы в расчетную формулу.

Окончательное заключение о наличии и уровне загрязнения образца дезоксиниваленолом принимается только на основе данных двумерной ТСХ.

9.2 Подтверждение наличия и количественное определение дезоксиниваленола с помощью двумерной ТСХ

Пластинку размечают тонкими карандашными линиями, не повреждая слоя силикагеля, согласно Приложению Б, Рисунок 2.

В правом нижнем углу на расстоянии 15 мм от краев пластинки наносят с помощью микрошприца 20 мкдм^3 раствора А. В левом нижнем углу пластинки наносят 2, 4 и 6 мкдм^3 стандартного раствора дезоксиниваленола, 2 мкдм^3 и 5 мкдм^3 раствора А. В верхнем правом углу пластинки наносят 2, 4 и 6 мкдм^3 стандартного раствора дезоксиниваленола, 10 мкдм^3 и 20 мкдм^3 раствора А. Пластинку помещают в камеру для ТСХ со смесью гексан-ацетон (3:2) и элюируют ее в первом направлении до достижения фронтом растворителя тонкой карандашной линии, проведенной в 5,5 см от верхнего края, пластинку извлекают из камеры и сушат на воздухе. Затем проводят элюирование пластинки во втором направлении смесью эфир-гексан-изопропиловый спирт-вода (77:18:4,5:0,5). После достижения фронтом растворителя карандашной линии, проведенной в 5,5 см от верхнего края пластинки, ее извлекают из камеры и сушат на воздухе. Обнаружение и количественное определение проводят аналогично по 9.1.

10 Контроль точности измерений

10.1 Контроль точности измерений (повторяемость и воспроизводимость) производят в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 5725-1 и ГОСТ ИСО 5725-2.

10.2 Внутренний оперативный контроль (ВОК) точности анализов включает контроль повторяемости, воспроизводимости и точности результатов анализов. При превышении нормативов ВОК точности проводят повторные анализы. При повторном превышении указанных нормативов анализы приостанавливают, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

10.3 Повторяемость параллельных определений контролируют для каждой анализируемой пробы согласно 8.2.3.

10.4 Для проведения ВОК воспроизводимости используют рабочие пробы. Пробу делят на две равные части и анализируют в соответствии с методикой, получая два результата анализа в разных лабораториях или в одной, причем в этом случае максимально варьируют условия проведения анализа, т. е. используют разные наборы мерной посуды, анализы выполняют в разные дни или два различных аналитика.

Воспроизводимость контрольных анализов, а также воспроизводимость результатов анализа рабочих проб, выполненных за период, в течение которого условия проведения анализа принимают за стабильные и соответствующие условиям проведения контрольных анализов, признают удовлетворительной, если $\left|\overline{X}_1 - \overline{X}_2\right| \le 0{,}01 \cdot R \cdot \overline{\overline{X}}$, где $\overline{O}_1$, $\overline{O}_2$, и $\overline{\overline{O}}$ - результаты анализа одной и той же пробы, полученные при варьирующих условиях в одной лаборатории или разных лабораториях, и их среднее арифметическое значение, соответственно; R - значение норматива ВОК воспроизводимости (Таблица 2).

Периодичность проведения ВОК воспроизводимости не реже одного раза в две недели.

10.5 Для проведения ВОК точности используют рабочие пробы с известной добавкой дезоксиниваленола (вомитоксина). Пробу делят на две равные части, первую из которых анализируют в соответствии с методикой, а во вторую вводят известную добавку дезоксиниваленола (вомитоксина), а затем анализируют в соответствии с методикой. Добавка должна составлять от 50 % до 150 % содержания дезоксиниваленола (вомитоксина) в анализируемой пробе. Результаты получают по возможности в одинаковых условиях, т. е. их получает один аналитик с использованием одного набора мерной посуды, одной партии реактивов и т. д.

Точность контрольных анализов признают удовлетворительной, если $\left|\vec{O}^{1} - \vec{O} - \tilde{N}\right| \le 0{,}01 \cdot \hat{E} \cdot \vec{O}$, где $\vec{O}^{1}$, $\vec{O}$ и С - результаты контрольных анализов пробы с известной добавкой, без добавки и значение добавки, соответственно; К - значение норматива ВОК точности при использовании метода добавок (Таблица 2).

Контроль точности анализа проводят не реже одного раза в месяц, а также при смене реактивов и после длительного перерыва в работе.

10.6 Результаты ВОК заносят в специальный журнал контроля.

Приложение А
(информационное)

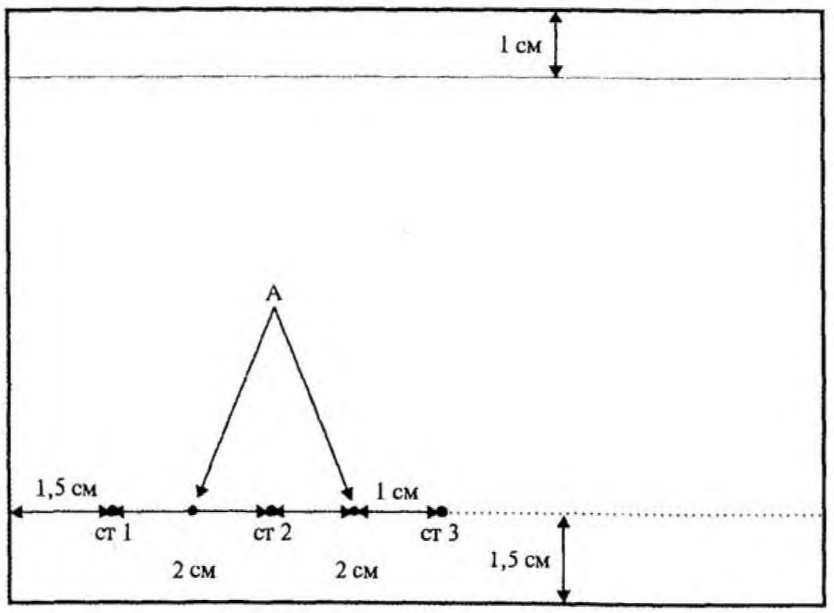
Экстракция дезоксиниваленола

Дезоксиниваленол является микотоксином, наиболее часто продуцируемым широко распространенными микроскопическими грибами рода Fusarium (F. graminearum, F. culmorum, F. roseum и др.), поражающими зерновые в ряде регионов страны.

Дезоксиниваленол (вомитоксин) - 3,7,15- тригидрокси-12,13-эпокси-трихотец-9-ен-8-он относится к группе трихотеценовых микотоксинов, вызывающих тяжелые алиментарные микотоксикозы у животных, которые характеризуются геморрагическим синдромом, отказом от корма, рвотой, поражением кроветворных и иммунокомпетентных органов.

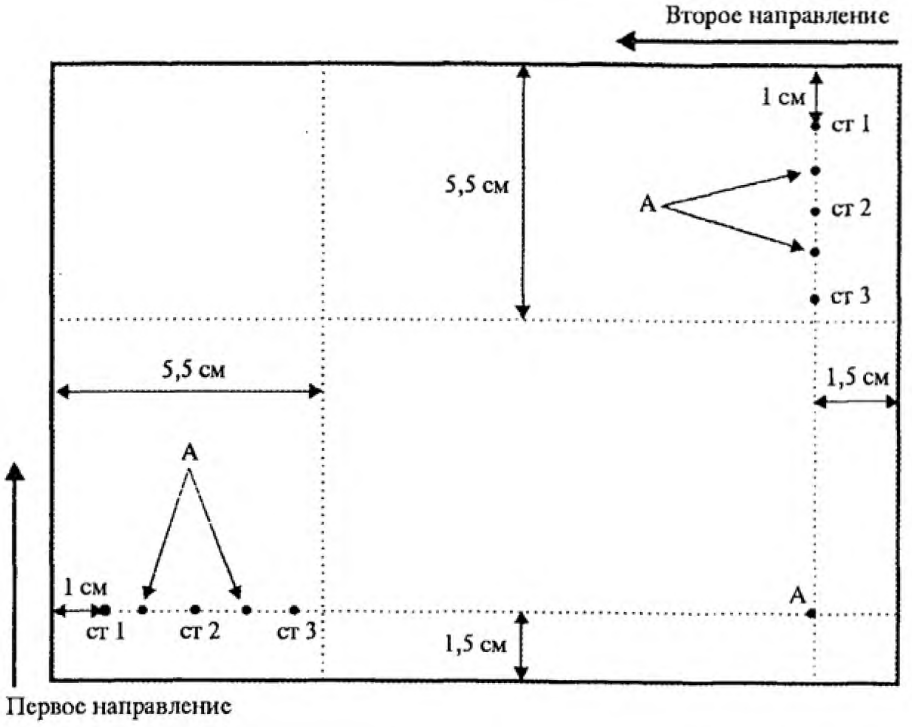
Дезоксиниваленол - бесцветное кристаллическое вещество с молекулярной массой 296 а.е.м., имеет слабо выраженный максимум поглощения УФ - света при длине волны 219 нм (4500 в метаноле), не обладает прямой флуоресценцией. Температура плавления от 151 °С до 153 °С. Дезоксиниваленол хорошо растворим в спиртах, воде, ацетонитриле, этилацетате, нерастворим в гексане и бензоле. Обнаружение дезоксиниваленола при тонкослойной хроматографии (ТСХ) производят по специфической флуоресценции после обработки раствором хлорида алюминия.

Приложение Б
(информационное)



ст1, ст2, ст3 – точки нанесения рабочих раствором микотоксинов; А – точки нанесения раствора А.

Рисунок 1 – Разметка пластины для одномерной ТСХ



ст1, ст2, ст3 – точки нанесения рабочих раствором микотоксинов; А – точки нанесения раствора А.

Рисунок 2 – Разметка пластины для двумерной ТСХ

УДК 633.-1/-2:543.544:006.35 **МКС 67.060**

Ключевые слова: зерно, продукты переработки зерна, дезоксиниваленол (вомитоксин), высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография, экстракция, очистка, градуировочный раствор.

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