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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
34140—
2017**

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ, КОРМА, ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ

Метод определения микотоксинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2017

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены в ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 1 июня 2017 г. № 51-2017)

За принятие проголосовали:

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

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 июля 2017 г. № 719-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 34140—2017 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2018 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «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, 2017

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Сущность метода 2
4 Требования безопасности и условия выполнения измерений 2
5 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, посуда и реактивы 2
6 Подготовка к проведению измерений 4
6.1 Подготовка лабораторной посуды и реактивов 4
6.2 Приготовление растворов 5
6.3 Приготовление градуировочных растворов 5
7 Отбор и подготовка проб 9
7.1 Отбор проб 9
7.2 Подготовка проб 9
8 Порядок выполнения анализа 10
8.1 Условия хроматографических измерений 10
8.2 Построение градуировочной характеристики 12
8.3 ВЭЖХ-МС/МС измерение 12
9 Метрологические характеристики 12
10 Обработка результатов измерений 18
11 Оформление результатов измерений 18
12 Контроль правильности и прецизионности результатов измерений 18

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ, КОРМА, ПРОДОВОЛЬСТВЕННОЕ СЫРЬЕ

Метод определения микотоксинов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

Food products, feed, food raw materials. Method for determination of mycotoxins by high performance liquid chromatography — mass spectrometry

Дата введения — 2018—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на пищевую продукцию, продовольственное сырье в части зерновых культур, корма, кормовое сырье в части зерновых и масличных культур, комбикорма и устанавливает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (далее — ВЭЖХ-МС/МС) для определения содержания микотоксинов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.005—88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007—76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019—79* Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.2.085—2002 Сосуды, работающие под давлением. Клапаны предохранительные. Требования безопасности

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ OIML R 76-1—2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 2603—79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

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

ГОСТ ISO 6497—2014 Корма. Отбор проб

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 6995—77 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

ГОСТ 13496.0—2016 Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы отбора проб

ГОСТ 13586.3—2015 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб

---

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019—2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

Издание официальное

ГОСТ 13979.0—86 Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Правила приемки и методы отбора проб

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

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

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

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 ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сущность метода

Метод основан на экстракции микотоксинов из анализируемой пробы, идентификации и количественном определении их по площадям пиков ион-продуктов с помощью градуировочной характеристики методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга выбранных реакций (MPM).

4 Требования безопасности и условия выполнения измерений

4.1 Применяемые в работе реактивы относятся к веществам 1-го и 2-го класса опасности по ГОСТ 12.1.007, при работе с ними необходимо соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005.

4.2 Помещения, в которых проводят анализ и подготовку проб, должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией.

4.3 Приготовление градуировочных растворов проводят в вытяжном шкафу.

4.4 При выполнении измерений с использованием жидкостного хроматографа соблюдают правила по электробезопасности по ГОСТ 12.1.019 и правила безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением по ГОСТ 12.2.085.

4.5 Применяемые средства измерений должны иметь свидетельства о поверке, вспомогательные устройства — свидетельства об аттестации, оформленные в соответствии с требованиями национального законодательства в области обеспечения единства измерений.

4.6 К выполнению измерений методом ВЭЖХ-МС/МС допускаются лица, владеющие техникой ВЭЖХ-МС/МС и изучившие инструкции по эксплуатации применяемой аппаратуры.

4.7 При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха . . . . . от 15°С до 30 °С;
- относительная влажность воздуха . . . . . от 20 % до 80 %.

5 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, посуда и реактивы

5.1 Для измерения содержания микотоксинов применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и посуду:

- весы неавтоматического действия высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с максимальной нагрузкой не более 150 г и пределами допускаемой погрешности не более ± 0,001 г;
- весы высокого (II) класса точности с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,02 мг;
- масс-спектрометр с квадрупольным анализатором с диапазоном измерений от 50 до 800 атомных единиц массы (а. е. м), массовым разрешением не менее 1,0 а. е. м на полувысоте пика, с погрешностью измерений массы не более ± 0,5 а. е. м, с режимом получения и анализа фрагментных ионов (режим МС/МС);
- систему высокоэффективную жидкостную хроматографическую, состоящую из градиентного насоса, системы фильтрования и дегазации подвижных фаз, термостата хроматографической колонки, обеспечивающего температуру нагрева до (40 ± 1) °С;

- колонку хроматографическую, заполненную обращенно-фазовым сорбентом С18 с размером частиц не более 5 мкм, длиной 150 мм и внутренним диаметром 2,1 мм;
- компьютер с установленным программным обеспечением для управления масс-спектрометром и обработки результатов измерений;
- баню ультразвуковую с рабочей частотой не менее 20 Гц и объемом не менее 1 $дм^3$;
- камеру лабораторную морозильную с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от минус 15 °С до минус 25 °С;
- мельницу лабораторную;
- сито лабораторное металлическое с ячейкой 0,5 мм;
- систему получения деионизированной воды высокой чистоты с удельным сопротивлением 18 МОм·см;
- холодильник бытовой с цифровым контроллером температуры и рабочим диапазоном температур от 2 °С до 8 °С;
- центрифугу лабораторную с центробежным ускорением не менее 3500 g и с адаптерами для пробирок вместимостью 50 $см^3$;
- центрифугу лабораторную с центробежным ускорением не менее 15 000 g и с адаптерами для микроцентрифужных пробирок;
- шейкер вибрационный для пробирок орбитального типа движения с амплитудой встряхивания 3 мм и диапазоном скоростей от 150 до 2000 об/мин;
- шейкер качающийся с частотой встряхивания от 2 до 50 об/мин;
- шкаф сушильный с максимальной температурой нагрева не менее 200 °С и погрешностью поддержания заданной температуры не более ± 5 °С;
- пробы, не содержащие микотоксинов, подготовленные и проанализированные ранее в соответствии с требованиями разделов 7 и 8, в зависимости от типа исследуемой матрицы («чистые» пробы)*;
- фильтры нейлоновые мембранные с размером диаметра пор не более 0,45 мкм;
- виалы (флаконы) полипропиленовые или пробирки полипропиленовые вместимостью 50 $см^3$ с завинчивающимися крышками;
- колбы 2—10—1 с пришлифованными пробками по ГОСТ 1770;
- колбы 1—100(1000)—2 по ГОСТ 1770;
- пипетки одноканальные переменной вместимости 20—200 $мм^3$ с пределом допускаемого относительного отклонения среднеарифметического значения фактического объема дозы от номинального не более ± 1,5 %;
- пипетки одноканальные переменной вместимости 100—1000 $мм^3$ с пределом допускаемого относительного отклонения среднеарифметического значения фактического объема дозы от номинального не более ± 1 %;
- пробирки микроцентрифужные полипропиленовые вместимостью 1,5 $см^3$;
- цилиндры 1—10(100,1000)—1 по ГОСТ 1770.

5.2 При определении содержания микотоксинов применяют следующие реактивы:
- ацетат аммония с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %;
- ацетон по ГОСТ 2603;
- ацетонитрил для ВЭЖХ-МС с массовой долей основного вещества не менее 99,9 %;
- воду деионизированную для ВЭЖХ, полученную с использованием системы производства ультрачистой воды из дистиллированной воды по ГОСТ 6709;
- кислоту уксусную по ГОСТ 61;
- метанол по ГОСТ 6995, х. ч;
- эфир этиловый уксусной кислоты (этилацетат) по ГОСТ 22300, ч. д. а.

5.3 При измерении содержания микотоксинов в качестве образцов сравнения для приготовления исходных растворов применяют соединения с массовой долей основного вещества не менее 97,0 %:
- 3-ацетил-дезоксиниваленол;
- 15-ацетил-дезоксиниваленол;
- агроклавин;
- альтернариол;
- альтернариола-метиловый эфир;

---

* Допускается в «чистых» пробах присутствие микотоксинов на уровне не более 0,2 % от нижнего градуировочного уровня для каждого микотоксина.

- афлатоксин B_1;
- афлатоксин B_2;
- афлатоксин G_1;
- афлатоксин G_2;
- боверицин;
- вортманнин;
- глиотоксин;
- гризеофульвин;
- дезоксиниваленол;
- дезоксиниваленол-3-глюкозид;
- деэпоксидезоксиниваленол;
- диацетоксисцирпенол;
- зеараленон;
- койевая кислота;
- мелеагрин;
- микофеноловую кислоту;
- монилиформин;
- НТ-2 токсин;
- неосоланиол;
- ниваленол;
- охратоксин А;
- охратоксин В;
- паксиллин;
- патулин;
- пенициллиновая кислота;
- рокфортин С;
- роридин А;
- стахиботрилактам;
- стеригматоцистин;
- Т-2 тетраол;
- Т-2 токсин;
- Т-2 триол;
- тентоксин;
- тенуазоновая кислота;
- фузаренон Х;
- фузариевая кислота;
- фумагиллин;
- фумонизин B_1;
- фумонизин B_2;
- фумонизин B_3;
- циклопиазоновая кислота;
- цитреовиридин;
- цитринин;
- эргокорнин.

5.4 Допускается применение других средств измерений и посуды, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерения, а также вспомогательных устройств, реактивов и материалов по качеству не ниже вышеуказанных.

6 Подготовка к проведению измерений

6.1 Подготовка лабораторной посуды и реактивов

6.1.1 Мойку и сушку посуды проводят в отдельном помещении, оборудованном приточно-вытяжной вентиляцией. Для сушки лабораторной посуды и подготовки реактивов необходимо использовать отдельные сушильные шкафы.

6.1.2 Стеклянную посуду подвергают стандартной процедуре очистки лабораторной посуды с последующей последовательной промывкой органическими растворителями: этилацетатом (однократно), ацетоном (дважды).

6.1.3 Процедуру промывки органическими растворителями следует проводить в вытяжном шкафу. Рекомендуется на стадиях промывки использовать ультразвуковую баню. Окончательную сушку посуды проводят в сушильном шкафу, установленном в вытяжном шкафу, при температуре от 105 °С до 110 °С.

6.1.4 Каждую новую партию реактивов проверяют на отсутствие контаминации анализируемыми соединениями путем проведения холостого опыта в соответствии с процедурой анализа.

6.2 Приготовление растворов

6.2.1 Приготовление растворов подвижных фаз А и Б

6.2.1.1 Подвижная фаза А

Для приготовления подвижной фазы А в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 приливают 890 см^3 деионизированной воды, добавляют 100 см^3 метанола, 10 см^3 уксусной кислоты и 0,2 г ацетата аммония, перемешивают.

6.2.1.2 Подвижная фаза Б

Для приготовления подвижной фазы Б в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 приливают 970 см^3 метанола, добавляют 20 см^3 деионизированной воды, 10 см^3 уксусной кислоты и 0,2 г ацетата аммония, перемешивают.

Срок хранения растворов при комнатной температуре — не более 3 мес.

6.2.2 Приготовление раствора для экстракции

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 790 см^3 ацетонитрила, 200 см^3 деионизированной воды и 10 см^3 уксусной кислоты, перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 3 мес.

6.3 Приготовление градуировочных растворов

Для приготовления исходных растворов C_0 с массовой концентрацией 1000 мкг/см^3 или C_0' с массовой концентрацией 100 мкг/см^3 для каждого микотоксина рассчитывают необходимую массу *i*-го вещества, мг, с точностью до первого десятичного знака, с учетом содержания основного вещества по формуле

$$m_i = \frac{C_0 \cdot V}{P_i} \cdot 100, \quad (1)$$

где C_0 — концентрация исходного раствора, мкг/см^3;

V — объем мерной колбы, см^3;

P_i — массовая доля основного вещества, %.

6.3.1 Приготовление исходных растворов C_0 фумонизина B_1, фумонизина B_2, фумонизина B_3, фузариевой кислоты, койевой кислоты

Для приготовления исходных растворов C_0 с массовой концентрацией 1000 мкг/см^3 в мерные колбы вместимостью 10 см^3 вносят по отдельности рассчитанные массы фумонизина B_1, фумонизина B_2, фумонизина B_3, фузариевой кислоты, койевой кислоты. Добавляют 8 см^3 ацетонитрила, перемешивают, помещают в ультразвуковую баню на 15 мин и доводят объем до метки ацетонитрилом.

6.3.2 Приготовление исходных растворов C_0'

Для приготовления исходных растворов C_0' с массовой концентрацией 100 мкг/см^3 в мерные колбы вместимостью 10 см^3 вносят по отдельности рассчитанные массы микотоксинов, перечисленных в 5.3 (за исключением микотоксинов, указанных в 6.3.1). Добавляют 8 см^3 ацетонитрила, перемешивают, помещают в ультразвуковую баню на 15 мин и доводят объем до метки ацетонитрилом.

Срок хранения растворов C_0 и C_0' при температуре от минус 15 °С до минус 25 °С — не более 12 мес.

Перед применением растворы выдерживают при комнатной температуре в темном месте не менее 30 мин.

6.3.3 Приготовление рабочего раствора микотоксинов C_1

Для приготовления рабочего раствора C_1 в мерную колбу вместимостью 100 см^3 вносят исходные растворы C_0 и C_0' в объемах, указанных в таблице 1, и доводят до метки ацетонитрилом.

Таблица 1 — Вносимый объем исходных растворов C_0 и C'_0

Микотоксин	Массовая концентрация микотоксина в исходном растворе C_0 или C'_0, мкг/см^3	Вносимый объем исходных растворов C_0 или C'_0, см^3	Массовая концентрация микотоксина в рабочем растворе C_1, мкг/см^3
3-Ацетил-дезоксиниваленол	100	100	1,0
15-Ацетил-дезоксиниваленол	100	100	1,0
Агроклавин	100	100	1,0
Альтернариол	100	100	1,0
Альтернариола-метиловый эфир	100	100	1,0
Афлатоксин B_1	100	10	0,1
Афлатоксин B_2	100	10	0,1
Афлатоксин G_1	100	10	0,1
Афлатоксин G_2	100	10	0,1
Боверицин	100	500	5,0
Вортманнин	100	100	1,0
Глиотоксин	100	100	1,0
Гризеофульвин	100	100	1,0
Дезоксиниваленол	100	500	5,0
Дезоксиниваленол-3-глюкозид	100	500	5,0
Деэпокси-дезоксиниваленол	100	100	1,0
Диацетоксисцирпенол	100	100	1,0
Зеараленон	100	200	2,0
Койевая кислота	1000	100	10,0
Мелеагрин	100	100	1,0
Микофеноловая кислота	100	100	1,0
Монилиформин	100	100	1,0
НТ-2 токсин	100	100	1,0
Неосоланиол	100	100	1,0
Ниваленол	100	500	5,0
Охратоксин А	100	10	0,1
Охратоксин В	100	10	0,1
Паксиллин	100	10	0,1
Патулин	100	100	1,0
Пенициллиновая кислота	100	100	1,0
Рокфортин С	100	100	1,0
Роридин А	100	100	1,0
Стахиботрилактам	100	100	1,0
Стеригматоцистин	100	100	1,0

Окончание таблицы 1

Микотоксин	Массовая концентрация микотоксина в исходном растворе C_0 или C_0', мкг/см^3	Вносимый объем исходных растворов C_0 или C_0', см^3	Массовая концентрация микотоксина в рабочем растворе C_1, мкг/см^3
Т-2 тетраол	100	100	1,0
Т-2 токсин	100	100	1,0
Т-2 триол	100	100	1,0
Тентоксин	100	100	1,0
Тенуазоновая кислота	100	100	1,0
Фузаренон Х	100	500	5,0
Фузариевая кислота	1000	100	10,0
Фумагиллин	100	100	1,0
Фумонизин B_1	1000	100	10,0
Фумонизин B_2	1000	100	10,0
Фумонизин B_3	1000	100	10,0
Циклопиазоновая кислота	100	100	1,0
Цитреовиридин	100	100	1,0
Цитринин	100	500	5,0
Эргокорнин	100	100	1,0

6.3.4 Приготовление рабочего раствора микотоксинов C_2

В мерную колбу вместимостью 10 см^3 вносят 1,0 см^3 рабочего раствора C_1, доводят до метки ацетонитрилом, перемешивают.

Растворы C_1 и C_2 хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 6 мес.

6.3.5 Приготовление матричных градуировочных растворов микотоксинов G_1—G_6

Матричные градуировочные растворы G_1—G_6 готовят в микроцентрифужных пробирках путем обработки экстрактов «чистых» проб согласно разделу 7, в которые вносят рабочие растворы определяемых микотоксинов C_1 и C_2 в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 — Приготовление матричных градуировочных растворов G_1—G_6

Матричный градуировочный раствор	Вносимый объем			
	подвижной фазы А, мм^3	рабочего раствора C_1, мм^3	рабочего раствора C_2, мм^3	экстракта «чистой» пробы, мм^3
G_1	490	—	10	500
G_2	480	—	20	500
G_3	400	—	100	500
G_4	480	20	—	500
G_5	400	100	—	500
G_6	300	200	—	500

Массовые концентрации микотоксинов в матричных градуировочных растворах приведены в таблице 3.

Таблица 3 — Массовые концентрации микотоксинов в матричных градуировочных растворах

Микотоксин	Массовая концентрация микотоксина, нг/см^3					
	G_1	G_2	G_3	G_4	G_5	G_6
3-Ацетил-дезоксиниваленол	1,0	2,0	10	20	100	200
15-Ацетил-дезоксиниваленол	1,0	2,0	10	20	100	200
Агроклавин	1,0	2,0	10	20	100	200
Альтернариол	1,0	2,0	10	20	100	200
Альтернариола-метиловый эфир	1,0	2,0	10	20	100	200
Афлатоксин B_1	0,1	0,2	1	2	10	20
Афлатоксин B_2	0,1	0,2	1	2	10	20
Афлатоксин G_1	0,1	0,2	1	2	10	20
Афлатоксин G_2	0,1	0,2	1	2	10	20
Боверицин	5,0	10,0	50	100	500	1000
Вортманнин	1,0	2,0	10	20	100	200
Глиотоксин	1,0	2,0	10	20	100	200
Гризеофульвин	1,0	2,0	10	20	100	200
Дезоксиниваленол	5,0	10,0	50	100	500	1000
Дезоксиниваленол-3-глюкозид	5,0	10,0	50	100	500	1000
Деэпокси-дезоксиниваленол	1,0	2,0	10	20	100	200
Диацетоксисцирпенол	1,0	2,0	10	20	100	200
Зеараленон	2	4,0	20	40	200	400
Койевая кислота	10,0	20,0	100	200	1000	2000
Мелеагрин	1,0	2,0	10	20	100	200
Микофеноловая кислота	1,0	2,0	10	20	100	200
Монилиформин	1,0	2,0	10	20	100	200
НТ-2 токсин	1,0	2,0	10	20	100	200
Неосоланиол	1,0	2,0	10	20	100	200
Ниваленол	5,0	10,0	50	100	500	1000
Охратоксин А	0,1	0,2	1	2	10	20
Охратоксин В	0,1	0,2	1	2	10	20
Паксиллин	0,1	0,2	1	2	10	20
Патулин	1,0	2,0	10	20	100	200
Пенициллиновая кислота	1,0	2,0	10	20	100	200
Рокфортин С	1,0	2,0	10	20	100	200
Роридин А	1,0	2,0	10	20	100	200
Стахиботрилактам	1,0	2,0	10	20	100	200
Стеригматоцистин	1,0	2,0	10	20	100	200

Окончание таблицы 3

Микотоксин	Массовая концентрация микотоксина, нг/см^3					
	G_1	G_2	G_3	G_4	G_5	G_6
Т-2 тетраол	1,0	2,0	10	20	100	200
Т-2 токсин	1,0	2,0	10	20	100	200
Т-2 триол	1,0	2,0	10	20	100	200
Тентоксин	1,0	2,0	10	20	100	200
Тенуазоновая кислота	1,0	2,0	10	20	100	200
Фузаренон Х	5,0	10,0	50	100	500	1000
Фузариевая кислота	10,0	20	100	200	1000	2000
Фумагиллин	1,0	2,0	10	20	100	200
Фумонизин B_1	10,0	20	100	200	1000	2000
Фумонизин B_2	10,0	20	100	200	1000	2000
Фумонизин B_3	10,0	20	100	200	1000	2000
Циклопиазоновая кислота	1,0	2,0	10	20	100	200
Цитреовиридин	1,0	2,0	10	20	100	200
Цитринин	5,0	10,0	50	100	500	1000
Эргокорнин	1,0	2,0	10	20	100	200

Пробирки встряхивают в вибрационном шейкере в течение 1 мин и проводят обработку пробы согласно разделу 7.

Срок хранения растворов G_1—G_6 при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 72 ч.

7 Отбор и подготовка проб

7.1 Отбор проб

7.1.1 Отбор проб зерна и продуктов переработки зерна — по ГОСТ 13586.3.

7.1.2 Отбор проб круп — по ГОСТ 26312.1.

7.1.3 Отбор проб муки и отрубей — по ГОСТ 27668.

7.1.4 Отбор проб кормов — по ГОСТ ISO 6497.

7.1.5 Отбор проб жмыхов, шротов — по ГОСТ 13979.0.

7.1.6 Отбор проб комбикормов, комбикормового сырья — по ГОСТ 13496.0.

7.2 Подготовка проб

Из средней пробы зерна, продуктов его переработки, круп, кормов, комбикормов, жмыхов, шротов выделяют около 100 г продукта, измельчают на лабораторной мельнице и просеивают через сито с отверстиями диаметром 0,5 мм, перемешивают.

Из средней пробы муки, отрубей выделяют около 100 г продукта, тщательно перемешивают.

Взвешивают 5,00 г подготовленной пробы и помещают в виалу или полипропиленовую пробирку вместимостью 50 см^3. Добавляют 25 см^3 раствора для экстракции (см. 6.2.2), помещают на 30 с в вибрационный шейкер, затем — для перемешивания в течение 60 мин на качающийся шейкер. Центрифугируют при 3500 g в течение 20 мин.

В микроцентрифужную пробирку вносят 500 мм^3 подвижной фазы А и 500 мм^3 верхнего слоя экстракта. Центрифугируют при 15 000 g при температуре 4 °С в течение 20 мин. Пипеточным дозатором отбирают 700 мм^3 верхнего слоя экстракта и фильтруют через микрофильтр с нейлоновой мембраной в виалу для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

8 Порядок выполнения анализа

8.1 Условия хроматографических измерений

8.1.1 Хромато-масс-спектрометр включают в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации и устанавливают параметры рабочих режимов масс-спектрометрического детектирования и хроматографического разделения.

8.1.2 Например, для колонки диаметром 2,1 мм, длиной 150 мм, с обращенно-фазовым сорбентом С18, с размером частиц не более 5,0 мкм, соблюдают следующие условия хроматографирования:

- температура колонки — 40 °С;
- скорость потока подвижной фазы — 0,25 $см^3$/мин;
- температура в отсеке устройства ввода проб — 10 °С.
- объем вводимой пробы — 20 $мм^3$.

Разделение проводят в режиме градиентного элюирования в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4 — Условия градиентного элюирования

Время, мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза Б, %
0,0	100	0
2,0	100	0
12,0	0	100
16,0	0	100
16,1	100	0
25,0	100	0

8.1.3 Параметры режима мониторинга множественных реакций (МРМ) при измерении микотоксинов приведены в таблицах 5 и 6.

Регистрацию положительных и отрицательных ионов проводят путем двух отдельных последовательных измерений.

Настройки масс-спектрометрического детектора (источника ионов, ионной оптики) устанавливают при внедрении метода на каждой единице оборудования путем прямого ввода анализируемых веществ в масс-спектрометр и установления оптимальных характеристик согласно рекомендациям производителя масс-спектрометра.

Таблица 5 — Параметры режима МРМ при регистрации положительных ионов

Микотоксин	Ион-предшественник, *m/z*	Ион-продукт 1/ ион-продукт 2
15-Ацетил-дезоксиниваленол	339	322/304
Агроклавин	239	183/208
Афлатоксин B_1	313	128/241
Афлатоксин B_2	315	259/287
Афлатоксин G_1	329	243/200
Афлатоксин G_2	331	245/189
Боверицин	807	384/784
Вортманнин	429	355/295

Окончание таблицы 5

Микотоксин	Ион-предшественник, *m/z*	Ион-продукт 1/ ион-продукт 2
Глиотоксин	327	263/245
Гризеофульвин	353	165/215
Диацетоксисцирпенол	384	307/105
Койевая кислота	143	69/113
Мелеагрин	434	403/334
Микофеноловая кислота	338	207/303
НТ-2 токсин	442	263/105
Неосоланиол	400	215/185
Охратоксин А	404	239/102
Охратоксин В	370	205/103
Паксиллин	436	182/167
Пенициллиновая кислота	171	125/97
Рокфортин С	390	193/322
Роридин А	550	249/231
Стахиботрилактам	386	178/150
Стеригматоцистин	325	310/281
Т-2 тетраол	316	215/281
Т-2 токсин	484	215/185
Т-2 триол	400	215/281
Фузариевая кислота	180	152/134
Фумагиллин	459	177/131
Фумонизин B_1	722	334/704
Фумонизин B_2	706	336/688
Фумонизин B_3	706	336/319
Цитреовиридин	403	139/297
Цитринин	251	233/205
Эргокорнин	562	544/223

Таблица 6 — Параметры режима МРМ при регистрации отрицательных ионов

Микотоксин	Ион-предшественник, *m/z*	Ион-продукт 1/ион-продукт 2
3-Ацетил-дезоксиниваленол	397	59/337
Альтернариол	257	213/215
Альтернариола-метиловый эфир	271	256/227

Окончание таблицы 6

Микотоксин	Ион-предшественник, *m/z*	Ион-продукт 1/ион-продукт 2
Дезоксиниваленол	295	59/265
Дезоксиниваленол-3-глюкозид	517	427/59
Деэпокси-дезоксиниваленол	339	59/249
Зеараленон	317	131/175
Монилиформин	97	41
Ниваленол	371	59/281
Патулин	153	109/135
Тентоксин	413	141/271
Тенуазоновая кислота	196	139/112
Фузаренон X	413	59/353
Циклопиазоновая кислота	335	140/195

8.2 Построение градуировочной характеристики

Построение и расчет градуировочной характеристики проводят в каждой серии измерений с помощью программного обеспечения хромато-масс-спектрометра.

8.2.1 Проводят однократные измерения не менее трех градуировочных растворов, приготовленных по 6.3.5, в порядке возрастания концентраций микотоксинов в соответствии с таблицей 3.

8.2.2 Вычисление площади пика проводят для каждого иона-продукта анализируемых микотоксинов. Допускается проведение количественных измерений по одному, наиболее интенсивному, иону-продукту.

8.2.3 При построении градуировочной характеристики используют линейную регрессию, при этом коэффициент корреляции должен быть не менее 0,98.

8.2.4 Построение линейного градуировочного графика и расчет концентрации микотоксинов в анализируемых пробах выполняются системой обработки данных в автоматическом режиме.

8.2.5 Градуировочную характеристику строят заново при каждой серии измерений.

8.3 ВЭЖХ-МС/МС измерение

8.3.1 Для измерения содержания микотоксинов проводят ВЭЖХ-МС/МС анализ в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации применяемого оборудования.

8.3.2 Анализ выполняют в виде серии измерений, включающей следующие образцы:

- подвижная фаза А;
- «чистая» проба;
- градуировочные растворы (см. 6.3.5);
- экстракты анализируемых проб, приготовленных по 7.2.

8.3.3 В инжектор хроматографа вводят 20 мм^3 пробы, подготовленной в соответствии с разделом 7, и проводят измерения в условиях, используемых при установлении градуировочной зависимости.

8.3.4 Определяют и регистрируют на хроматограмме время удерживания пиков двух ионов-продуктов каждого микотоксина, соответствующее времени удерживания, найденному при измерении градуировочных растворов.

9 Метрологические характеристики

Установленный в настоящем стандарте метод обеспечивает выполнение измерений содержания микотоксинов с относительной расширенной неопределенностью результатов аналитических измерений при коэффициенте охвата k = 2 и доверительной вероятности P = 0,95, указанной в таблице 7.

Таблица 7 — Показатели точности и прецизионности метода при измерении содержания микотоксинов

Микотоксин	Диапазон измерений содержания, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности ± U_i, %, при коэффициенте охвата k = 2	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости) σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R, %	Предел повторяемости r, % (при P = 0,95, k = 2)
3-Ацетил-дезоксиниваленол	От 100 до 2000 включ.	38	12	18	33
15-Ацетил-дезоксиниваленол	От 100 до 1000 включ.	68	16	32	45
	Св. 1000 до 2000 включ.	35	11	16	30
Агроклавин	От 10 до 200 включ.	51	18	24	50
	Св. 200 до 1000 включ.	36	11	17	30
Альтернариол	От 10 до 20 включ.	74	21	35	59
	Св. 20 до 200 включ.	54	16	25	43
	От 200 до 2000 включ.	33	10	16	28
Альтернариола-метиловый эфир	От 20 до 200 включ.	74	23	35	63
	Св. 200 до 1000 включ.	63	13	30	36
	Св. 1000 до 2000 включ.	41	7	19	19
Афлатоксин B_1	От 1 до 20 включ.	53	15	25	42
	Св. 20 до 200 включ.	31	10	14	28
Афлатоксин B_2	От 1 до 20 включ.	53	15	25	42
	Св. 20 до 200 включ.	31	10	14	28
Афлатоксин G_1	От 1 до 20 включ.	53	15	25	42
	Св. 20 до 200 включ.	31	10	14	28
Афлатоксин G_2	От 1 до 20 включ.	53	15	25	42
	Св. 20 до 200 включ.	31	10	14	28
Боверицин	От 50 до 1000 включ.	67	20	31	56
	Св. 1000 до 10000 включ.	43	13	20	36
Вортманнин	От 20 до 100 включ.	43	18	31	51
	Св. 100 до 2000 включ.	19	12	16	34

Продолжение таблицы 7

Микотоксин	Диапазон измерений содержания, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности ± U_i, %, при коэффициенте охвата k = 2	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости) σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R, %	Предел повторяемости r, % (при P = 0,95, k = 2)
Глиотоксин	От 100 до 2000 включ.	54	21	30	58
Гризеофульвин	От 20 до 2000 включ.	46	15	22	42
Дезоксиниваленол	От 100 до 500 включ.	70	22	33	61
	Св. 500 до 10000 включ.	58	20	27	55
Дезоксиниваленол-3-глюкозид	От 100 до 200 включ.	72	17	34	48
	Св. 200 до 2000 включ.	48	13	23	36
Деэпокси-дезоксиниваленол	От 200 до 2000 включ.	75	14	35	40
Диацетоксисцирпенол	От 10 до 200 включ.	50	14	23	38
	Св. 200 до 2000 включ.	34	11	16	30
Зеараленон	От 20 до 40 включ.	65	18	31	51
	Св. 40 до 400 включ.	39	12	18	32
	Св. 400 до 4000 включ.	31	7	14	20
Койевая кислота	От 10 000 до 20 000 включ.	65	21	30	59
Мелеагрин	От 20 до 200 включ.	46	16	22	45
	Св. 200 до 2000 включ.	28	8	13	21
Микофеноловая кислота	От 20 до 100 включ.	43	12	20	33
	Св. 100 до 2000 включ.	31	12	16	33
Монилиформин	От 20 до 200 включ.	62	23	29	65
	Св. 200 до 2000 включ.	48	11	23	30
НТ-2 токсин	От 10 до 20 включ.	61	17	25	47
	Св. 20 до 1000 включ.	54	17	25	47
	Св. 1000 до 2000 включ.	35	9	17	24

Продолжение таблицы 7

Микотоксин	Диапазон измерений содержания, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности ± U_j, %, при коэффициенте охвата k = 2	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости) σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R, %	Предел повторяемости r, % (при P = 0,95, k = 2)
Неосоланиол	От 10 до 20 включ.	58	15	23	41
	Св. 20 до 2000 включ.	36	12	17	32
Ниваленол	От 100 до 500 включ.	54	21	26	58
	Св. 500 до 5000 включ.	54	12	25	33
	Св. 5000 до 10 000 включ.	39	13	18	36
Охратоксин А	От 1 до 10 включ.	72	16	34	43
	Св. 10 до 20 включ.	47	12	22	33
	Св. 20 до 200 включ.	32	10	15	29
Охратоксин В	От 1 до 20 включ.	62	20	29	56
	Св. 20 до 200 включ.	34	8	16	23
Паксиллин	От 20 до 200 включ.	43	13	20	35
Патулин	От 1000 до 2000 включ.	73	23	34	65
Пенициллиновая кислота	От 20 до 1000 включ.	65	23	31	65
	Св. 1000 до 2000 включ.	48	17	23	47
Рокфортин С	От 10 до 100 включ.	68	19	32	53
	Св. 100 до 2000 включ.	38	13	18	35
Роридин А	От 20 до 100 включ.	65	18	31	51
	Св. 100 до 2000 включ.	56	14	22	39
Стахиботрилактам	От 10 до 20 включ.	69	25	32	70
	Св. 20 до 200 включ.	44	10	21	27
	Св. 200 до 2000 включ.	33	10	16	28

Продолжение таблицы 7

Микотоксин	Диапазон измерений содержания, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности ± U_j, %, при коэффициенте охвата k = 2	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости) σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R, %	Предел повторяемости r, % (при P = 0,95, k = 2)
Стеригматоцистин	От 10 до 100 включ.	53	21	25	57
	Св. 100 до 1000 включ.	38	11	18	31
	Св. 1000 до 2000 включ.	24	9	14	25
Т-2 тетраол	От 100 до 200 включ.	54	24	29	67
	Св. 200 до 2000 включ.	52	15	25	42
Т-2 токсин	От 10 до 100 включ.	46	13	22	37
	Св. 100 до 2000 включ.	38	11	18	30
Т-2 триол	От 20 до 100 включ.	54	15	26	41
	Св. 100 до 2000 включ.	43	10	20	27
Тентоксин	От 20 до 1000 включ.	53	11	25	30
	Св. 1000 до 2000 включ.	25	8	12	22
Тенуазоновая кислота	От 20 до 1000 включ.	67	21	31	58
	Св. 1000 до 2000 включ.	41	13	19	35
Фузаренон X	От 500 до 10 000 включ.	50	12	23	33
Фузариевая кислота	От 100 до 1000 включ.	75	16	35	44
	Св. 1000 до 2000 включ.	44	16	21	44
	Св. 2000 до 20 000 включ.	33	12	16	34
Фумагиллин	От 100 до 200 включ.	56	12	26	33
	Св. 200 до 2000 включ.	29	10	14	29
Фумонизин B_1	От 100 до 1000 включ.	71	12	33	32
	Св. 1000 до 20 000 включ.	44	12	21	32

Окончание таблицы 7

Микотоксин	Диапазон измерений содержания, мкг/кг	Значение относительной расширенной неопределенности ± U_j, %, при коэффициенте охвата k = 2	Показатель повторяемости (относительное стандартное отклонение повторяемости) σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное стандартное отклонение воспроизводимости) σ_R, %	Предел повторяемости r, % (при P = 0,95, k = 2)
Фумонизин B_2	От 100 до 10 000 включ.	67	22	31	60
	Св. 10 000 до 20 000 включ.	30	9	14	26
Фумонизин B_3	От 100 до 2000 включ.	62	18	29	50
	Св. 2000 до 10 000 включ.	48	11	23	31
	Св. 10 000 до 20 000 включ.	37	9	17	26
Циклопиазоновая кислота	От 20 до 100 включ.	74	29	35	81
	Св. 100 до 200 включ.	65	13	30	35
	Св. 200 до 2000 включ.	49	9	23	25
Цитреовиридин	От 100 до 1000 включ.	49	14	23	40
	Св. 1000 до 2000 включ.	27	10	13	29
Цитринин	От 50 до 100 включ.	68	19	32	53
	Св. 100 до 1000 включ.	44	14	20	39
	Св. 1000 до 2000 включ.	27	10	13	29
Эргокорнин	От 20 до 200 включ.	49	14	23	40
	Св. 200 до 2000 включ.	28	10	13	29

10 Обработка результатов измерений

10.1 В соответствии с данными, полученными при анализе градуировочных растворов, проводят количественную обработку хроматограмм с использованием программного обеспечения, получая значения массовой концентрации микотоксинов в анализируемой пробе.

10.2 Содержание микотоксина в пробе X, мкг/кг, вычисляют по формуле

$$X = 2\frac{X_i \cdot V}{m}, \quad (2)$$

где 2 — фактор разведения экстракта;

X_i — массовая концентрация микотоксина в анализируемой пробе, определенная по градуировочному графику, нг/см^3;

V — объем раствора для экстракции, см^3;

m — масса навески, г.

10.3 За результат измерений принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений пробы, если выполнено условие приемлемости по ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 5.2.2).

11 Оформление результатов измерений

Содержание i-го микотоксина, мкг/кг, представляют в виде

$$\overline{X}_i \pm 0{,}01 \cdot U_i \cdot \overline{X}_i \quad \text{при } P = 0{,}95, \quad (3)$$

где $\overline{X}_i$ — среднеарифметическое значение вычислений двух параллельных измерений содержания i-го микотоксина в анализируемой пробе, мкг/кг;

U_i — значение относительной расширенной неопределенности содержания i-го микотоксина для соответствующего диапазона измерений, % (в соответствии с таблицей 7);

$0{,}01 \cdot U_i \cdot \overline{X}_i$ — значение расширенной неопределенности в абсолютных единицах, мкг/кг.

Числовое значение результата измерений должно оканчиваться цифрой того же разряда, что и значение расширенной неопределенности, содержащее не более двух значащих цифр и выраженное в микрограммах на килограмм (мкг/кг).

12 Контроль правильности и прецизионности результатов измерений

Контроль правильности и прецизионности результатов измерений в пределах лаборатории осуществляют по ГОСТ ИСО 5725-6 (пункт 6.2.3) с использованием контрольных карт Шухарта.

УДК 633.1:636.086.1:636.087.26:006.354

МКС 65.120
67.050
67.060

Ключевые слова: пищевые продукты, продовольственное и кормовое сырье, комбикорма, корма, микотоксины, метод определения содержания с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием

БЗ 8—2017/243

Редактор *Л.С. Зимилова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 20.07.2017. Подписано в печать 27.07.2017. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,51. Тираж 26 экз. Зак. 1226.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123001 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru