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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
ISO 17372—
2016**

КОРМА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Определение содержания зеараленона методами иммуноаффинной колоночной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии

(ISO 17372:2008, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены 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 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт кормов имени В.Р. Вильямса (ФГБНУ «ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (от 28 июня 2016 г. № 49)

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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 6 сентября 2016 г. № 1060-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 17372—2016 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2018 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 17372:2008 «Корма для животных. Определение зеараленона иммуноаффинной колоночной хроматографией и высокоэффектиной жидкостной хроматографией» («Animal feeding stuffs — Determination of zearalenone by immunoaffinity column chromatography and high performance liquid chromatography», IDT), включая Изменение 1 (Amd 1:2013). Изменение к указанному международному стандарту, принятое после его официальной публикации, внесено в текст настоящего стандарта и выделено двойной вертикальной линией, расположенной на полях напротив соответствующего текста.

Международный стандарт разработан техническим комитетом по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты», подкомитетом SC 10 «Корма для животных» Международной организации по стандартизации (ISO).

Официальный экземпляр международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, имеется в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

6 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

© Стандартинформ, 2016

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 Реактивы 2
5 Оборудование, посуда и вспомогательные материалы 3
6 Отбор проб 4
7 Подготовка проб для анализа 4
8 Проведение анализа 5
9 Обработка результатов 8
10 Прецизионность 8
11 Протокол испытаний 9
Приложение А (справочное) Подтверждение с использованием нормально-фазовой хроматографии 10
Приложение В (справочное) Результаты межлабораторных испытаний 12
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам 14
Библиография 15

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

КОРМА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Определение содержания зеараленона методами иммуноаффинной колоночной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии

Animal feeding stuffs. Determination of zearalenone by immunoaffinity column chromatography and high performance liquid chromatography

Дата введения — 2018—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения зеараленона в кормах для животных и в сырье для их производства, включая ячмень, кукурузу, овес, рожь, пшеницу, муку соевых бобов, муку из семян рапса, кукурузный глютен, сухую спиртовую барду, чечевицу и жом сахарной свеклы. Предел количественного определения зеараленона 0,05 мг/кг (50 мкг/кг). При проведении соответствующих испытаний лабораторией пользователя может быть достигнут более низкий предел количественного определения.

Настоящий стандарт не распространяется на силос, обогащенный мелассой, в связи с высоким содержанием в нем сахара.

2 Нормативные ссылки

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

ISO 565, Test sieves — Metal wire cloth, perforated metal plate and electroformed sheet — Nominal sizes of openings (Сита контрольные. Проволочная ткань, перфорированные пластины и листы, изготовленные гальваническим методом. Номинальные размеры отверстий)

ISO 648, Laboratory glassware — single volume pipettes (Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной меткой)

ISO 1042, Laboratory glassware — One-mark volumetric flasks (Посуда лабораторная стеклянная. Мерные колбы с одной меткой)

ISO 3696, Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

ISO 4788, Laboratory glassware — Graduated measuring cylinders (Посуда лабораторная стеклянная. Мерные градуированные цилиндры)

ISO 6498:2012 Animal feeding stuffs — Guideelines for sample preparation (Корма для животных. Руководящие указания по приготовлению проб для испытания)[1)]

[1)] Действует взамен ISO 6498:1998 «Animal feeding stuffs. Preparation of test samples».

Издание официальное

3 Сущность метода

Анализируемую пробу экстрагируют ацетонитрилом, разбавленным водой, и фильтруют. Затем аликвоту фильтрата разбавляют водой или солевым фосфатным буфером (далее — ФБС) и очищают на иммуноаффинной колонке (далее — ИАК). Очищенные экстракты анализируют методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) с флуориметрическим детектированием. Присутствие зеараленона в пробе может быть подтверждено оценкой отношения величин эмиссии при возбуждении на двух длинах волн (236 и 274 нм), либо с использованием нормально-фазовой ВЭЖХ, либо применением диодно-матричного детектора.

4 Реактивы

Используют реактивы только признанной аналитической чистоты, если не указано иначе.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Работы со всеми реактивами проводят в вытяжном шкафу. Используют защитные очки и защитную одежду, избегая контакта реактивов с кожей.

4.1 Вода 1-й степени чистоты по ISO 3696.

4.2 Ацетонитрил (CH_3CN) для ВЭЖХ.

4.3 Метанол (CH_3OH) для ВЭЖХ.

4.4 Хлористый натрий (NaCl) массовой долей основного вещества не менее 99%.

4.5 Экстрагирующий растворитель объемной долей ацетонитрила φ (CH_3CN) = 90 %.

Смешивают 900 $см^3$ ацетонитрила (4.2) с 100 $см^3$ воды (4.1). Тщательно перемешивают.

4.6 Разбавленный ацетонитрил объемной долей φ (CH_3CN) = 50%.

Смешивают один объем ацетонитрила (4.2) с одним объемом воды (4.1). Хорошо перемешивают. Раствор используется в случае применения автосамплера.

4.7 Разбавленный метанол объемной долей φ (CH_3OH) = 30 %.

Смешивают 75 $см^3$ метанола (4.3) с 175 $см^3$ воды (4.1). Тщательно перемешивают.

4.8 Двузамещенный фосфорнокислый натрий (Na_2HPO_4) массовой долей основного вещества не менее 99 %.

4.9 Однозамещенный фосфорнокислый калий (KH_2PO_4) массовой долей основного вещества не менее 99 %.

4.10 Хлористый калий (KCl) массовой долей основного вещества не менее 99 %.

4.11 Гидроксид натрия (NaOH) массовой долей основного вещества не менее 99 %.

4.12 Солевой фосфатный буфер (ФСБ)

Растворяют в 1 $дм^3$ воды (4.1) 8 г хлористого натрия (4.4), 1,16 г двузамещенного фосфорнокислого натрия (4.8), 0,2 г однозамещенного фосфорнокислого калия (4.9) и 0,2 г хлористого калия (4.10). Устанавливают значение pH 7,4 ед. pH с помощью раствора гидроксида натрия (4.13). Допускается использование готового концентрированного ФБС, разбавленного перед использованием.

4.13 Раствор гидроксида натрия, *c* (NaOH) = 0,2 моль/$дм^3$

Растворяют 8 г гидроксида натрия (4.11) в 1 $дм^3$ воды.

4.14 Подвижная фаза для ВЭЖХ

Помещают 460 $см^3$ ацетонитрила (4.2) в колбу вместимостью 1 $дм^3$, добавляют 460 $см^3$ воды (4.1) и 80 $см^3$ метанола (4.3). Тщательно перемешивают и фильтруют через фильтр (5.13).

4.15 Основной стандартный раствор зеараленона с номинальным значением массовой концентрации 50 мкг/$см^3$

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Зеараленон — микотоксин, обладающий эстрогенным действием. При обращении с ним следует учитывать его биологическую активность.

Взвешивают 5,0 мг зеараленона с точностью ± 0,1 мг. Помещают в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ (5.1.2). Растворяют в ацетонитриле (4.2) и доводят раствор до метки этим же растворителем.

Фактическое значение массовой концентрации зеараленона в основном стандартном растворе определяют следующим образом.

Отбирают пипеткой (5.1.3) 4,0 $см^3$ основного стандартного раствора зеараленона, переносят в мерную колбу вместимостью 25 $см^3$ (5.1.2), доводят до метки ацетонитрилом (номинальное значение массовой концентрации зеараленона в полученном растворе 8 мкг/$см^3$).

Измеряют оптическую плотность в ультрафиолетовой (УФ) области при длине волны 274 нм, используя кварцевую кювету с длиной оптического пути 10 мм. Определяют концентрацию зеараленона $\rho(C_{18}H_{22}O_5)$, в мг/см^3, по формуле

$$\rho(C_{18}H_{22}O_5) = \frac{M_r \cdot 1000 \cdot A \cdot 25}{\varepsilon \cdot 4},$$

где M_r — относительная молекулярная масса зеараленона, равная 318,4 г/моль;

A — оптическая плотность при 274 нм;

ε — молярный коэффициент поглощения зеараленона при 274 нм, равный (12623 ± 111), моль · дм$^{-3}$ · см$^{-1}$.

Результаты округляют до трех значащих цифр.

Основной стандартный раствор устойчив в течение не менее 1 года при его хранении в холодильнике в плотно закрытом виде. Каждый раз при приготовлении свежих стандартных растворов (4.16 и 4.17) проводят определение концентрации основного раствора.

4.16 Рабочий стандартный раствор зеараленона номинального значения массовой концентрации 5,0 мкг/см^3

Разбавляют 10 см^3 основного стандартного раствора (4.15) до 100 см^3 экстрагирующим растворителем (4.5). Хранят в холодильнике.

Срок хранения раствора 6 месяцев.

4.17 Стандартные растворы для градуировки хроматографа

Готовят пять стандартных растворов зеараленона со значениями массовой концентрации, приведенными в таблице 1, путем разбавления рабочего стандартного раствора (4.16) или стандартного раствора (4.17.1) подвижной фазой (4.14).

Приготовление ВЭЖХ стандартных растворов (4.17.1—4.17.5) приведено в таблице 1.

Таблица 1 — Приготовление ВЭЖХ стандартных растворов

Градуировочный стандартный раствор	Исходный стандартный раствор	Объем исходного стандартного раствора, см^3	Конечный объем, см^3	Номинальное значение массовой концентрации зеараленона, мкг/см^3
4.17.1	4.16	2,0	50	0,20
4.17.2	4.16	1,5	50	0,15
4.17.3	4.16	1,0	50	0,10
4.17.4	4.16	1,0	100	0,050
4.17.5	4.17.1	5,0	50	0,020

Все ВЭЖХ стандартные растворы хранят в холодильнике. Срок хранения растворов 6 месяцев.

5 Оборудование, посуда и вспомогательные материалы

Используют стандартное лабораторное оборудование, в частности следующее

5.1 Лабораторная стеклянная посуда.

5.1.1 Мерные цилиндры по ISO 4788, класс А[1)].

5.1.2 Мерные колбы по ISO 1042, класс А.

5.1.3 Пипетки по ISO 648, класс А.

5.2 УФ спектрофотометр.

5.3 Вакуумное устройство для подключения ИАК.

[1)] Данное требование является аутентичным переводом текста на русский язык. Используют мерную посуду 2-го класса точности.

5.4 Конические колбы вместимостью 125 и 500 см^3.

5.5 Фильтровальная бумага диаметром 185 мм, например, Whatman No. 41[1)].

5.6 Стеклянная пробирка вместимостью 5 см^3 (13 × 100 мм) круглодонная или аналогичная.

5.7 Центрифужные пробирки из полипропилена или аналогичного материала, вместимостью 50 см^3.

5.8 Стеклянные воронки с максимальным внутренним диаметром 60 мм и 90 мм.

5.9 Стекловолоконная фильтровальная бумага диаметром 125 мм, например Whatman 93АН[1)].

5.10 Иммуноаффинные колонки емкостью 2 мкг зеараленона, обеспечивающие извлечение зеараленона не менее 85 %, ZearalaTest[1)] (стандартная или WB (предпочтительнее как менее склонные забиваться) и EASI-EXTRACT[1)].

5.11 Шейкер вращательного или поступательного типа или аналогичные.

5.12 Пластиковые шприцы вместимостью 5 см^3.

5.13 Одноразовые шприцевые фильтры из поливинилиденфторида с размером пор 0,45 мкм и диаметром 13 мм.

5.14 Система для фильтрования растворителя: полностью стеклянный фильтровальный аппарат, подходящий для фильтра диаметром 47 мм (5.15) и фильтра из нейлона (полиамида) или из полифтортетраэтилена (PTFE) диаметром 47 мм и размером пор 0,45 мкм.

5.15 ВЭЖХ система состоящая из:

5.15.1 Насоса безпульсационного с потоком от 0,5 см^3/мин до 1,5 см^3/мин.

5.15.2 Системы для ввода пробы вручную или автосамплер с петлей 100 мм^3.

5.15.3 Аналитической колонки размером частиц 4 или 5 мкм, стационарная фаза C_{18}, размером 150 мм x 4 мм, например Waters Nova-Pak C_{18}[1)], Intertsil ODS-3[1)], Lichrospher 100-RP-18[1)], ACE 3 C_{18}[1)], Waters Symmetry Shield RP18[1)] и Hypersil ODS/BDS[1)].

5.15.4 Флуориметрического детектора для измерений с длинами волн возбуждения 236 и 274 нм и регистрации при 440 нм (детектор с переменной длины волны) или 418 нм (фильтровый детектор).

5.15.5 Интегратора или ПК.

5.15.6 Диодно-матричный детектор, если предусмотрено его применение.

5.16 Стекловолоконные фильтры диаметром 21 мм, например, Whatman GF/D[1)]

5.17 Резервуары полипропиленовые, которые могут быть закреплены над ИАК, вместимостью 20 см^3 и внутренним диаметром 20 мм. Может потребоваться адаптер.

5.18 Фритты для резервуаров (5.17), диаметром 20 мм и размером пор 20 мкм.

5.19 Сита по ISO 525.

5.20 Испаритель в токе азота с баней, поддерживающей температуру (50 ± 5) °С.

5.21 Мешалка вортекс[1)].

6 Отбор проб

В лабораторию направляют представительную пробу. Она не должна быть повреждена или изменена при транспортировании или хранении.

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. Рекомендуемый метод отбора проб приведен в [1].

Пробы следует хранить в замороженном виде, чтобы предотвратить изменения в содержании микотоксинов из-за роста плесеней.

7 Подготовка проб для анализа

Пробу для анализа готовят в соответствии с ISO 6498.

Всю лабораторную пробу размалывают до полного прохождения через сито с номинальным размером отверстий 1 мм (5.19). Тщательно перемешивают.

Исследования с другими микотоксинами показали, что при размоле проб до прохода через сито с отверстиями 0,5 мм улучшается экстракция из проб, благодаря чему уменьшается расхождение результатов параллельных определений. Во избежание перегрева пробы при размалывании рекомендуется

[1)] Пример имеющегося в продаже продукта. Эта информация предоставляется для удобства пользователей настоящего стандарта и не указывает на предпочтение, оказываемое этому продукту. Можно использовать другие продукты, обеспечивающие сопоставимые результаты.

использовать сито с круглыми отверстиями 0,75 мм; при этом основная часть измельчаемого материала будет проходить через сито с номинальными отверстиями размером 0,5 мм.

8 Проведение анализа

8.1 Подготовка пробы для контроля качества

С каждой партией проб анализируют контрольную пробу, содержащую зеараленон (0,10 мг/кг). Для ее получения пипеткой добавляют 1,0 $см^3$ рабочего стандартного раствора зеараленона (4.16) к 50 г чистой пробы пшеницы или кукурузы и перемешивают. Анализируют также чистую пробу. При этом выход зеараленона должен составлять не менее 85 %.

8.2 Экстракция зеараленона

Взвешивают 50,00 г анализируемой пробы с погрешностью ± 0,01 г в коническую колбу вместимостью 500 $см^3$ (5.4).

Взвешивают и добавляют 5 г хлористого натрия (4.4).

Приливают 150 $см^3$ экстрагирующего растворителя (4.5). Закрывают пробкой и встряхивают в течение 1 ч. Далее анализ продолжают по процедуре очистки на ИАК (8.3).

Такие пробы, как например, высушенный силос, могут абсорбировать большую часть из 150 $см^3$ экстрагирующего растворителя. В этом случае увеличивают объем экстрагирующего растворителя до 200 $см^3$ или до 250 $см^3$.

8.3 Очистка на иммуноаффинной колонке

Следуют инструкциям производителей ИАК, используя резервуар (5.17) с фриттом (5.18) и GF/D фильтром (фильтрами) (5.16) для колонок ZearalaTest[1)] (по 8.3.1) и EASI-EXTRACT[1)] (по 8.3.2), и элюируют 2,0 $см^3$ элюента.

Для колонок других марок используют более подходящий для них вариант из числа приведенных ниже (см. 8.3.1 и 8.3.2).

Для устранения мешающих влияний при анализе сильно окрашенных проб или проб, содержащих вещества, мешающие при проведении хроматографического разделения, используют метанол с объемной долей 30 % (4.7), который не вызывает денатурации антител. Объемная доля метанола не должна превышать 35 %. Элюаты выпаривают и затем растворяют в минимальном объеме (2,0 $см^3$) подвижной фазы (4.14).

Примечания

1 Более 10 $см^3$ разбавленного фильтрата можно наносить на колонки при работе по 8.3.1.4 и 8.3.2.5 при условии, что не превышается емкость колонки. При нанесении больших объемов фильтрата могут забиваться фритт и колонка; например, известны проблемы при анализе пробы ячменя, хотя использование двух фильтров на фритте помогает предотвратить блокирование. Широкие колонки менее чувствительны к блокированию.

2 Наличие нерастворенных частиц в фильтрате может негативно влиять на эффективность колонки. Частички пробы, оставшиеся в фильтрате, препятствуют адсорбции зеараленона на антителах, приводя к нестабильности результатов и низкому выходу зеараленона.

8.3.1 Проведение очистки экстракта на иммуноаффинной колонке ZearalaTest[1)] (5.10)

8.3.1.1 Фильтруют более 10 $см^3$ экстракта через складчатый фильтр из фильтровальной бумаги (5.5) в коническую колбу вместимостью 125 $см^3$ (5.4).

8.3.1.2 Пипеткой (5.1.3) переносят 10 $см^3$ профильтрованного экстракта в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$ (5.1.2) и объем экстракта доводят до метки водой. Тщательно перемешивают. Разбавленный экстракт (около 25 $см^3$) фильтруют через стекловолоконную фильтровальную бумагу (5.9) в центрифужную пробирку вместимостью 50 $см^3$ (5.7).

8.3.1.3 Присоединяют ИАК к вакуумному устройству (5.3). Прикрепляют резервуар (5.17) с фриттом (5.18) к верху колонки. Для WB колонок требуется адаптер. Вставляют в резервуар стекловолоконный фильтр (5.16).

[1)] Пример имеющегося в продаже продукта. Эта информация предоставляется для удобства пользователей настоящего стандарта и не указывает на предпочтение, оказываемое этому продукту. Можно использовать другие продукты, обеспечивающие сопоставимые результаты.

8.3.1.4 Пипеткой (5.1.3) переносят 10 см^3 фильтрата (8.3.1.2) в резервуар. Пропускают экстракт через колонку с постоянной скоростью (от одной до двух капель в секунду) до прохода воздуха через колонку.

8.3.1.5 При анализе сильно окрашенных проб и проб, на хроматограммах которых появляются мешающие пики, колонку промывают 15 см^3 метанола объемной долей 30 %, (4.7) со скоростью от одной до двух капель в секунду до прохода воздуха через колонку. Для всех других типов проб колонку промывают 10 см ^{3} воды со скоростью от одной до двух капель в секунду до прохода воздуха через колонку.

8.3.1.6 Резервуар убирают, прикрепляют другой резервуар без фритта (не требуется для WB колонок). Зеараленон элюируют 2,0 см^3 метанола (4.3) со скоростью около одной капли в секунду, собирая элюат в пробирку вместимостью 5 см^3 (5.6).

Примечание — Фритт можно удалять из использованного резервуара проволокой или палочкой через дно резервуара, который после очистки можно использовать вновь.

8.3.1.7 Элюат выпаривают досуха в токе азота, используя испаритель с баней (5.20) при температуре (50 ± 5) °С. Для растворения высушенного элюата добавляют в пробирку 2,0 см^3 подвижной фазы (4.14). Перемешивают мешалкой вортекс (5.21). Анализ продолжают по 8.4.

8.3.1.8 Если анализируемый раствор содержит взвесь, его фильтруют через фильтр (5.13), используя пластиковый шприц. Партия фильтров должна быть проверена на отсутствие интерферирующего пика (пиков). При использовании фриттов (5.18) и фильтров в резервуарах (5.17) анализируемые растворы должны быть прозрачными и не нуждаться в фильтровании.

8.3.2 Проведение очистки экстракта на иммуноаффинной колонке EASI-EXTRACT[1)]

8.3.2.1 Фильтруют более 10 см^3 экстракта через складчатую фильтровальную бумагу (5.5) в коническую колбу вместимостью 125 см^3 (5.4).

8.3.2.2 Переносят пипеткой (5.1.3) 10 см^3 профильтрованного экстракта в колбу вместимостью 50 см^3 (5.1.2), разбавляют экстракт до метки буфером ФБС (4.12). Тщательно перемешивают.

8.3.2.3 Разбавленный экстракт (приблизительно 25 см^3) фильтруют через стекловолоконную фильтровальную бумагу (5.9) в центрифужную пробирку вместимостью 50 см^3 (5.7).

8.3.2.4 Присоединяют ИАК к вакуумному устройству (5.3). Прикрепляют резервуар (5.17) с фриттом (5.18) сверху колонки, используя адаптер. Вставляют стекловолоконный фильтр (5.16). Промывают колонку от 10 до 20 см^3 буфером ФБС.

Если профильтрованный раствор не содержит взвеси (8.3.2.3), то фритт или фильтр не требуются.

8.3.2.5 Пипеткой (5.1.3) 10 см^3 фильтрата (8.3.2.3) переносят в резервуар. Пропускают экстракт через колонку с постоянной скоростью (от одной до двух капель в секунду) до прохода воздуха через колонку.

8.3.2.6 При анализе сильно окрашенных проб и проб, на хроматограммах которых появляются мешающие пики, колонку промывают 15 см^3 метанола объемной доли 30 % (4.7) со скоростью от одной до двух капель в секунду до прохода воздуха через колонку. Для всех других типов проб колонку промывают 20 см^3 воды со скоростью от одной до двух капель в секунду до прохода воздуха через колонку.

8.3.2.7 После удаления резервуара зеараленон элюируют 2,0 см^3 ацетонитрила (4.2) со скоростью около 1 капли в секунду, собирая элюат в пробирку вместимостью 5 см^3 (5.6).

8.3.2.8 Элюат выпаривают досуха в токе азота, используя испаритель с температурой бани (50 ± 5) °С (5.20). Для растворения высушенного элюата в пробирку добавляют 2,0 см^3 подвижной фазы ВЭЖХ (4.14). Тщательно перемешивают на мешалке вортекс (5.21).

8.3.2.9 Если анализируемый раствор содержит взвесь, его фильтруют через фильтр (5.13), используя пластиковый шприц. Партия фильтров должна быть проверена на отсутствие мешающего пика (пиков). При использовании фриттов и фильтров в резервуаре анализируемые растворы должны быть прозрачными и не нуждаться в фильтровании.

8.4 Хроматографический анализ

8.4.1 Условия хроматографического анализа

Подвижная фаза — см. 4.14.

Скорость потока — 1,0 см^3/мин.

[1)] Пример имеющегося в продаже продукта. Эта информация предоставляется для удобства пользователей настоящего стандарта и не указывает на предпочтение, оказываемое этому продукту. Можно использовать другие продукты, обеспечивающие сопоставимые результаты.

Объем вводимой пробы — 100 мм^3.

Колонка — см. 5.15.3, с предохранительной колонкой (стационарная фаза C_{18}).

Рабочие длины волн детектора — возбуждение 274 нм, регистрация — 440 нм (для детектора с переменной длиной волны) или 418 нм (для фильтрового детектора).

8.4.2 Контроль пригодности системы

8.4.2.1 Разрешение

Вводят ВЭЖХ стандартный раствор (4.17.4) массовой концентрации 0,050 мкг/см^3. Должен быть получен единственный пик. Однако, если имеется соседний пик, пик зеараленона должен быть разрешен до базовой линии.

8.4.2.2 Фактор размывания пика

Фактор размывания пика Фармакопеи Соединенных Штатов Америки, численно равный коэффициенту асимметрии пика F Европейской Фармакопеи, должен быть менее 1,6.

8.4.3 Проведение хроматографического анализа

8.4.3.1 Вводят 100 мм^3 (полная петля) стандартного раствора ВЭЖХ массовой концентрации 0,020 мкг/см^3 (4.17.5). Выполняют два или более ввода стандартных растворов, обеспечивая повторяемость площади пика не более 2 %.

Определяют линейность градуировочной характеристики — зависимости значения площади пика от концентрации зеараленона (мкг/см^3), для чего вводят в хроматограф 100 мм^3 (полная петля) каждого стандартного раствора для градуировки (4.17). Коэффициент корреляции должен быть не менее 0,999 и при 95 %-ном доверительном интервале градуировочная кривая должна проходить через начало координат.

8.4.3.2 Вводят 100 мм^3 анализируемых растворов. После окончания ввода партии анализируемых растворов вводят пять стандартных растворов (4.17) и усредняют площади пиков с данными, полученными по 8.4.3.1 для построения градуировочного графика. Для контроля дрейфа после ввода серии из пяти — восьми анализируемых растворов вводят 100 мм^3 стандартного раствора. Если площадь пика анализируемого раствора превышает площадь пика от градуировочного раствора максимальной концентрации, анализируемый раствор разбавляют.

8.4.3.3 Если массовая доля зеараленона в анализируемой пробе превышает 3 мг/кг, во избежание перегрузки ИАК анализируемый экстракт (8.2) разбавляют в 10 раз экстрагирующим растворителем (4.5), затем повторяют процедуры, установленные в 8.3.

8.4.3.4 Присутствие зеараленона в потенциально положительных пробах подтверждаются использованием длины волны возбуждения 236 нм (будет наблюдаться повышение чувствительности) или применением диодно-матричного детектора. Используют любой метод, установленный в 8.4.3.5, 8.4.3.6 или 8.4.3.7.

8.4.3.5 В случае использования флуоресцентного детектора с дейтериевой лампой используют анализируемые растворы по 8.3.1.7 или 8.3.2.8. Регулируют диапазон детектора или ослабляют интегратор для получения схожего отклика пика как в 8.4.3.1. Идентичность подтверждается, если отношение площадей пиков при 236 нм и 274 нм постоянно и не различается для стандартного и анализируемого растворов. Отношения площадей пиков анализируемых растворов должны быть в пределах 5 % отношений для соответствующих стандартных растворов.

8.4.3.6 Если применяется детектор флуоресценции с ксеноновой искровой лампой, определение отношения пиков при обращенно-фазовой хроматографии может оказаться невозможным, поскольку интенсивность лампы слишком низка при 236 нм. Проверяют возможность применения для данного детектора процедуры по 8.4.3.4.1; если это невозможно, то присутствие зеараленона подтверждают используя метод нормально-фазовой хроматографии (см. приложение А). Анализ пробы (проб) и контрольной пробы повторяют вновь, начиная с пункта 8.3, но при выпаривании элюата зеараленона (8.3.1.7 или 8.3.2.8) добавляют 2,0 см^3 смеси хлороформа, гексана и изопропанола, в объемном отношении 50 + 50 + 3, соответственно (А.1.2). Далее анализ продолжают согласно А.3, используя колонку для ВЭЖХ, заполненную силикагелем (см. А.2).

8.4.3.7 Если применяется диодно-матричный детектор, используют анализируемые растворы по 8.3.1.7 или 8.3.2.8. Регистрируют спектр (от 200 до 400 нм) пика со временем удерживания зеараленона и сравнивают со спектром стандартного раствора. Должны быть видны три максимума поглощения (236, 274 и 316 нм) и относительные интенсивности пиков должны быть подобными для анализируемого и стандартного растворов. Максимум пика пробы должен находиться в пределах ± 2 нм от максимума пика стандарта. Пороговое значение коэффициента общности более 950 из 1 000 для спектров пиков также подтверждает присутствие зеараленона.

Примечание — Возможно, что диодно-матричные детекторы недостаточно чувствительны для уровней содержания зеараленона, близких к пределу количественного определения. Может потребоваться увеличение длительности анализа, чтобы избежать появления медленно элюирующихся пиков на следующей хроматограмме, а также изменение состава подвижной фазы (см. 4.14) для достижения необходимой селективности в условиях появления дополнительных пиков при данном способе детектирования.

9 Обработка результатов

Массовую долю зеараленона в пробе, w_s, мг/кг, вычисляют по формуле (1) или формуле (2)

$$w_s = \rho_t \cdot \frac{150}{m} \cdot \frac{50}{10} \cdot \frac{2}{V} \cdot f_d, \quad (1)$$

$$w_s = \frac{A_t}{A_{st}} \cdot \rho_{st} \cdot \frac{150}{m} \cdot \frac{50}{10} \cdot \frac{2}{V} \cdot f_d, \quad (2)$$

где ρ_t — массовая концентрация зеараленона в анализируемом растворе, мкг/см^3;

A_t — площадь пика зеараленона в анализируемом растворе;

A_{st} — площадь пика зеараленона в стандартном растворе;

ρ_{st} — массовая концентрация зеараленона в стандартном растворе, мкг/см^3;

m — масса анализируемой пробы, г;

V — объем фильтрата в 8.3.1.4 или 8.3.1.5, см^3;

f_d — коэффициент разбавления (равен 1, если конечный объем равен 2 см^3). Результат округляют до трех значащих цифр.

Пример

A_t — 65224

A_{st} — 72578

ρ_{st} — 0,0510 мкг/см^3

m — 50,10 г

Конечный объем — 2 см^3

V (8.3.1.4) — 10 см^3

$$w_s = \frac{65224}{72578} \cdot 0{,}0510 \cdot \frac{150}{50.10} \cdot \frac{50}{10} \cdot \frac{2}{10} = 0{,}137$$

10 Прецизионность

10.1 Межлабораторные испытания

Значения показателей повторяемости и воспроизводимости были получены в соответствии с [6] и [7] (см. приложение В) при межлабораторных сравнительных испытаниях, проведенных в 2005 году. При валидации метода в условиях одной лаборатории было показано, что он применим для всех видов кормов и злаков, муки из соевых бобов, семян рапса, глютена кукурузы, сухой барды, чечевицы и жома сахарной свеклы.

10.2 Повторяемость

Абсолютное расхождение между результатами двух отдельных независимых испытаний, полученными одним и тем же методом на одной испытуемой пробе в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором на одном и том же оборудовании в течение короткого промежутка времени не должно

превышать более чем в 5 % случаев относительный предел повторяемости, $r_{отн}$, полученный по формуле (4)

$$r_{отн} = 2,8 \cdot CV(r), \quad (4)$$

где $CV(r)$ — коэффициент вариации повторяемости.

10.3 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между результатами двух отдельных испытаний, полученными одним и тем же методом на одной испытуемой пробе в разных лабораториях разными операторами на разном оборудовании, не должно превышать более чем в 5 % случаев относительный предел воспроизводимости, $R_{отн}$, полученный по формуле (5).

$$R_{отн} = 2,8 \cdot CV(R), \quad (5)$$

где $CV(R)$ — коэффициент вариации воспроизводимости.

Значения повторяемости и воспроизводимости, полученные из данных таблицы В.2, приведены в таблице 2.

Таблица 2 — Значения повторяемости и воспроизводимости

Параметр	Значение, %
$CV(r)$, максимальное значение	12,1
$CV(r)$, усредненное значение[a]	9,25
$r_{отн}$, максимальное значение	34,0
$r_{отн}$, среднее[a]	25,9
$CV(R)$, максимальное значение	19,7
$CV(R)$, усредненное значение[a]	15,4
$R_{отн}$, максимальное значение	55,3
$R_{отн}$, усредненное значение[a]	43,1
[a] Определяли путем дисперсионного анализа. Исследования показывают, что анализ вариабельности не зависит от матрицы и концентрации зеараленона.	

10.4 Предел количественного определения

Предел количественного определения 0,05 мг/кг (50 мкг/кг).

11 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен включать:

a) информацию, необходимую для полной идентификации пробы;

b) метод отбора пробы, если он известен;

c) использованный метод вместе со ссылкой на настоящий стандарт;

d) все подробности анализа, не установленные в настоящем стандарте, рассматриваемые как необязательные, вместе с подробностями любых случайностей, которые могли оказать влияние на результат(ы) анализа;

e) результат анализа и, если контролировалась повторяемость, конечный полученный результат.

Приложение А
(справочное)

Подтверждение с использованием нормально-фазовой хроматографии

А.1 Реактивы

А.1.1 Подвижная фаза

Смешивают дихлорметан, гексан, изопропанол и уксусную кислоту в объемных соотношениях 485 + 484 + 50 + 1, соответственно.

А.1.2 Растворитель для приготовления стандартных растворов

Смешивают хлороформ, гексан и изопропанол в объемных соотношениях 50 + 50 + 3, соответственно, и перемешивают.

А.1.3 Стандартные растворы для подтверждения

Готовят пять стандартных растворов зеараленона со значениями массовой концентрации, приведенными в таблице А.1, для чего разбавляют рабочий стандартный раствор (4.16) или стандартный раствор (А.1.3.1) растворителем по А.1.2.

Таблица А.1 — Приготовление стандартных растворов для подтверждения

Стандартный раствор для подтверждения	Исходный стандартный раствор	Объем исходного стандартного раствора, $см^3$	Конечный объем, $см^3$	Номинальное значение массовой концентрации зеараленона, $мкг/см^3$
А.1.3.1	4.16	2,0	50	0,20
А.1.3.2	4.16	1,5	50	0,15
А.1.3.3	4.16	1,0	50	0,10
А.1.3.4	4.16	1,0	100	0,050
А.1.3.5	А.1.3.1	5,0	50	0,020

Все стандартные растворы хранят в холодильнике. Срок хранения растворов — 6 месяцев.

А.2 Колонка

Оборудование для ВЭЖХ, установленное в 5.15, а также:
колонка 5 мкм Zorbax SIL[1)] длиной 250 мм и диаметром 4,6 мм или аналогичная.

А.3 Хроматографический анализ

А.3.1 Условия хроматографического анализа

Подвижная фаза	см. А.1.1
Скорость потока	1,0 $см^3$/мин
Объем инжекции	100 $мм^3$
Основа колонки	силикагель
Длины волн детектора (для детектора с двойным монохроматором)	возбуждение — 236 нм эмиссия — 440 нм

А.3.2 Контроль пригодности системы

Вводят 100 $мм^3$ стандартного раствора зеараленона концентрации 0,050 $мкг/см^3$ (А.1.3.4; 100 $мм^3$ содержит 5,0 нг зеараленона). Коэффициент удерживания должен быть не менее 2,0. При необходимости модифицируют подвижную фазу, регулируя содержание изопропанола.

[1)] Пример имеющегося в продаже продукта. Эта информация предоставляется для удобства пользователей настоящего стандарта и не указывает на предпочтение, оказываемое этому продукту. Можно использовать другие продукты, обеспечивающие сопоставимые результаты.

Выполняют два или более вводов стандартных растворов, чтобы убедиться в повторяемости площади пиков в пределах 2 %.

Проверяют линейность зависимости значения площади пика от концентрации зеараленона, для чего вводят в хроматограф по 100 мм^3 каждого стандартного раствора (А.1.3). Строят график, откладывая значения площадей пиков на оси абсцисс, а значения соответствующей им массы зеараленона в нанограммах — на оси ординат. Коэффициент корреляции должен быть не менее 0,999, и при 95 %-ном доверительном интервале точка пересечения зависимости с осью *y* должна включать нуль.

А.3.3 Определение

Вводят 100 мм^3 анализируемого раствора (при необходимости его разбавляют в соответствии с концентрацией, определенной обращенно-фазовой хроматографией). Каждые две инъекции анализируемого раствора сопровождают инъекцией 100 мм^3 соответствующего стандартного раствора.

Идентичность подтверждена, если отношение откликов пиков при 236 и 274 нм одинаково для стандартного и анализируемого растворов. Отношение пиков анализируемых проб должно быть в пределах 5 % отношения пиков стандартного раствора.

Приложение В
(справочное)

Результаты межлабораторных испытаний

В.1 Метод и пробы

Межлабораторные испытания организованы и проведены в соответствии с [6] и [7]. В качестве анализируемых проб выбраны девять материалов. От 2,5 до 5 кг каждого материала измельчали на мельнице Retsch SR3 mill[1)] до прохождения через сито с отверстиями 1,00 мм (60—80 % измельченного материала проходит через сито 0,5 мм). Измельченный материал перемешивали в течение 2 ч, затем разделяли на лабораторные пробы массой 50—60 г на ротационном разделителе Retsch PTZ divider[1)]. Гомогенность лабораторных проб устанавливали путем анализа пяти или более случайно отобранных лабораторных проб. Описание и результаты испытания гомогенности каждого материала приведены в таблице В.1.

В межлабораторных испытаниях приняли участие всего 20 лабораторий из 13 европейских стран, Канады, США, Японии и Уругвая. Исследование проведено в две фазы: ознакомительная стадия, включающая анализы и подтверждение пробы с добавкой двух загрязненных проб, и совместная исследовательская фаза, включающая анализ слепых проб. На основе результатов анализов, выполненных в ознакомительной фазе, для межлабораторных испытаний выбрано 13 лабораторий. Анализировали всего 20 лабораторных проб, из них девять проб по таблице 1 в качестве слепых, и слепые чистые пробы кукурузы и пшеницы. Чистая проба пшеницы использована для контроля процедуры подготовки пробы. Все лаборатории представили приемлемые данные в течение установленных временных рамок. Две лаборатории столкнулись с мешающими пиками на хроматограммах, указывающими на загрязнение. Источник загрязнения не мог быть идентифицирован, но изменение состава подвижной фазы или изменение аналитической колонки позволили представить результаты. Поэтому некоторые данные этих лабораторий включены в статистическую оценку. Во всех лабораториях две чистые пробы определены как «зеараленон не обнаружен» или на следовом уровне (менее 0,01 мг/кг). Во всех лабораториях получен приемлемый выход зеараленона (от 89 до 116 %) для двух контрольных проб пшеницы (средний выход 102,6 %; $S_{отн}$, 6,88 %).

Таблица В.1 — Показатели гомогенности проб

№ пробы и описание	Гомогенность аналитических результатов			ИАК промывающий раствор
	n	Среднее арифметическое, мг/кг	*s*, %	
1 Ячмень	5	0,111	6,72	Вода (4:1)
2 Ячмень	5	0,161	1,58	Вода (4:1)
3 Кукуруза	5	0,0765	6,50	Вода (4:1)
4 Кукуруза	5	0,120	6,74	Вода (4:1)
5 Кукуруза	5	0,281	3,66	Вода (4:1)
6 Корм для молочного скота	5	0,142	5,60	Метанол, объемная доля 30 % (4.7)
7 Сухая пивная барда	5	0,279	2,09	Метанол, объемная доля 30 % (4.7)
8 Корм для свиней	5	0,115	2,57	Вода (4:1)
9 Пшеница	5	0,202	5,74	Вода (4:1)

В.2 Статистический анализ результатов

Результаты анализов слепых проб были проверены на наличие индивидуальной систематической ошибки путем последовательного использования критерия Кохрена и Граббса по [6] и [7], статистической программой AOACI 2001. Пределы повторяемости *r* и воспроизводимости *R* вычисляли, как предусмотрено правилами, после удаления выбросов. Диапазон значений индекса Горвица, который представляет собой отношение коэффициента вариации воспроизводимости к предсказанному коэффициенту воспроизводимости, при котором метод признавал-

[1)] Пример имеющегося в продаже продукта. Эта информация предоставляется для удобства пользователей настоящего стандарта и не указывает на предпочтение, оказываемое этому продукту.

ся эффективным, составлял от 0,5 до 1,5, что является пределами для оценки приемлемости [6] и [7]. Значения пределов повторяемости, воспроизводимости и индексов Горвица приведены в таблице В.2.

Таблица В.2 — Результаты межлабораторных испытаний

Параметр	№ пробы								
	1 яч-мень	2 ячмень	3 куку-руза	4 куку-руза	5 куку-руза	6 корм для мо-лочного скота	7 сухая спирто-вая барда	8 корм для сви-ней	9 пшени-ца
Количество лабораторий после устранения выбросов	13	13	13	13	12	13	12	12	13
Учтенная массовая фракция зеараленона, мкг/кг	111	161	76,5	120	281	142	279	115	202
Средняя массовая фракция зеараленона, мкг/кг	115	166	79,6	122	273	134	250	120	189
Стандартное отклонение повторяемости s_r, мкг/кг	14,0	12,1	9,13	10,2	18,2	13,2	14,6	11,9	18,4
Коэффициент вариации повторяемости $CV(r)$, %	12,1	7,28	11,5	8,36	6,67	9,84	5,84	9,92	9,72
Предел повторяемости r, мкг/кг	39,1	33,8	25,6	28,5	51,0	37,0	40,9	33,4	51,5
Относительный предел повторяемости, t, $r_{отн}$, среднего определенного содержания	34,0	20,4	32,2	23,4	18,7	27,6	16,4	27,8	27,2
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/кг	20,4	22,1	11,9	18,4	37,5	22,3	33,4	23,7	23,6
Коэффициент воспроизводимости $CV(R)$, %	17,7	13,3	14,9	15,1	13,8	16,6	13,4	19,7	12,5
Предел воспроизводимости R, мкг/кг	57,1	61,8	33,2	51,6	105	62,4	93,6	66,4	66,1
Относительный предел воспроизводимости среднего определенного содержания t, $R_{отн}$, %	49,7	37,2	41,7	42,3	38,5	46,6	37,4	55,3	35,0
Значение критерия HorRat	0,80	0,63	0,64	0,69	0,71	0,77	0,68	0,90	0,61

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
ISO 565:1990	—	*
ISO 648: 2008	IDT	ГОСТ 29169—91 (ИСО 648—77) «Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной меткой»
ISO 3696:1987	IDT	ГОСТ ISO 3696—2013 «Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля»
ISO 1042:83 ISO 4788:80	IDT	ГОСТ 1770—74 (ISO 1042:83, ISO 4788:80) «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия»
ISO 6498:2012	IDT	ГОСТ ISO 6498—2014 «Корма, комбикорма. Подготовка проб для испытаний»

*Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык международного стандарта ISO 565:1990. Официальный перевод данного международного стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:

- IDT — идентичные стандарты.

Библиография

[1] ISO 6497, Animal feeding stuffs — Sampling (Корма для животных — Отбор проб)

[2] Josephs, R. D., Krska, R., Macdonald, S., Wilson, P., Petterson, H. Preparation of a calibrant as certified reference material for determination of the Fusarium mycotoxin zearalenone. J. AOAC Int. 2003, 86, p. 50—60

[3] VICAM. ZearalaTest™ instruction manual, p. 31, p. 34. Vicam, Watertown, MA, 1998

[4] Kruger, S. C., Kohn, B., Ramsey, C. S., Prioli, R. Rapid immunoaffinity-based method for determination of zearalenone in corn by fluorometry and liquid chromatography. J. AOAC Int. 1999, 82, p. 1364—1368

[5] R-BIOPHARM RHÔNE. EASI-EXTRACT® ZEARALENONE instructions for use (supplied with the immunoaffinity columns). R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow, 2003

[6] FAZEKAS, B., TAR, A. Determination of zearalenone content in cereals and feedstuffs by immunoaffinity column coupled with liquid chromatography. J. AOAC Int. 2001, 84, p. 1453—1459

[7] AOAC. Collaborative study guidelines. J. AOAC Int., 1995, 78, p. 143A—160A

[8] AOAC. Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. In: Official methods of analysis of AOAC International, 17th edition. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, 2000 12 p. Available [2008-01-14] at: gost.e-ecolog.ru

УДК 633.1001.4:006.354 МКС 65.120 IDT

Ключевые слова: корма, метод, зеараленон, иммуноаффинная колонка, ВЭЖХ

Редактор *Е.В. Костылева*
Технический редактор *В.Ю. Фотиева*
Корректор *В.Е. Нестерова*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 08.09.2016. Подписано в печать 14.09.2016. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 2,11. Тираж 32 экз. Зак. 2184.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru