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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ EN 14526— 2015

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение сакситоксина и DC-сакситоксина в мидиях. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением предколоночной дериватизации методом пероксидного или периодатного окисления

(EN 14526:2004, 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—92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» на основе собственного аутентичного перевода на русский язык европейского регионального стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 октября 2015 г. № 81-П)

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
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 октября 2015 г. № 1673-ст межгосударственный стандарт ГОСТ EN 14526—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен европейскому региональному стандарту EN 14526:2004 Foodstuffs — Determination of saxitoxin and dc-saxitoxin in mussels — HPLC method using pre-column derivatization with peroxide or periodate oxidation (Продукты пищевые. Определение сакситоксина и DC-сакситоксина в мидиях. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением предколоночной дериватизации методом пероксидного или периодатного окисления).

Международный стандарт разработан техническим комитетом CEN/TC 275 «Анализ пищевых продуктов. Горизонтальные методы», секретариатом которого считается DIN.

Перевод с немецкого языка (de).

Официальные экземпляры европейского регионального стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и европейского регионального стандарта, на который дана ссылка, имеются в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным европейским региональным стандартам приведены в дополнительном приложении ДА.

Степень соответствия — идентичная (IDT)

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 1
4 Реактивы 2
5 Оборудование и материалы 4
6 Процедура проведения испытания 5
7 Проведение измерений методом ВЭЖХ 7
8 Установление градуировочной характеристики 8
9 Идентификация аналита 8
10 Обработка результатов 8
11 Прецизионность 8
12 Протокол испытаний 9
Приложение А (справочное) Данные по прецизионности методики 10
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным европейским региональным стандартам 11
Библиография 12

Введение

В основе настоящего стандарта лежит метод Lawrence и Menard [1]. В методе-оригинале аналит выделяют из пробы путем твердофазной экстракции на обращенно-фазовом сорбенте с привитыми октадецильными группами (C_{18}), после чего проводят его очистку также методом твердофазной экстракции на слабом катионообменнике. При этом токсины моллюсков разделяют на три различные группы путем использования элюентов различной ионной силы и полярности. Далее проводят пероксидную или периодатную дериватизацию каждой группы токсинов по отдельности с тем, чтобы обеспечить наиболее достоверную идентификацию пиков их производных на хроматограмме. Настоящий стандарт распространяется на определение только сакситоксина и декарбамоил-сакситоксина (DC-сакситоксина), поэтому в приведенном в нем методе используется только очистка на обращенно-фазовом сорбенте.

Приведенный в настоящем стандарте метод предполагает возможность выбора между экстракцией уксусной кислотой и соляной кислотой. Выбор аналитиком способа экстракции зависит от цели испытания.

Экстракция соляной кислотой при температуре кипения приводит к частичному гидролизу паралитических токсинов моллюсков, приводящему к трансформации многих из этих токсинов (C-1, C-2, GTX-6) в их токсичные аналоги (GTX-2, GTX-3, сакситоксин). Этот процесс в той или иной мере происходит также в желудке человека. Поэтому данный способ экстракции можно использовать для приблизительной оценки общей токсичности продукта в данном отношении.

Экстракция уксусной кислотой при более низких температурах является более мягким способом, при котором профиль токсинов в пробе практически не меняется. Этот способ экстракции может быть применен, когда важнее установить безопасность продукта в отношении только некоторых токсинов. Экстракция уксусной кислотой применяется при изготовлении аттестованных образцов сравнения паралитических токсинов моллюсков ([2], [3]).

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение сакситоксина и DC-сакситоксина в мидиях. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением предколоночной дериватизации методом пероксидного или периодатного окисления

Foodstuffs. Determination of saxitoxin and DC-saxitoxin in mussels.
HPLC method using pre-column derivatization with peroxide or periodate oxidation

Дата введения — 2017—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения сакситоксина и декарбамоил-сакситоксина (DC-сакситоксина) в мидиях. Метод применим также для других моллюсков, например для гребешков. Метод обеспечивает предел количественного определения (при отношении уровня аналитического сигнала к уровню шума, равном 10) 0,006 мг/кг (млн$^{-1}$) для сакситоксина и 0,02 мг/кг (млн$^{-1}$) для DC-сакситоксина. Метод прошел валидацию путем межлабораторных испытаний при содержании (массовой доле) сакситоксина в пробах 0,4 мг/кг (млн$^{-1}$) и 0,5 мг/кг (млн$^{-1}$) и при содержании (массовой доле) DC-сакситоксина в пробе 0,4 мг/кг (млн$^{-1}$) и 1,6 мг/кг (млн$^{-1}$).

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходим следующий ссылочный документ. Для недатированной ссылки применяют последнее издание ссылочного документа (включая все его изменения).

EN ISO 3696 Water for analytical laboratory use — Specification and test methods (ISO 3696:1987) (Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

3 Сущность метода

Паралитические токсины моллюсков экстрагируют из гомогенизированной пробы уксусной или соляной кислотой. После центрифугирования надосадочную жидкость очищают методом твердофазной экстракции на патроне с обращенно-фазовым сорбентом (C_{18}). Аликвоту экстракта подвергают дериватизации перекисью водорода.

Предупреждение — Паралитические токсины моллюсков являются сильными нейротоксинами. При проведении испытания следует использовать перчатки и защитные очки, а все операции по подготовке стандартных растворов и проб следует проводить в вытяжном шкафу.

При дериватизации сакситоксина и DC-сакситоксина образуются различные продукты окисления, которые определяют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием обращенно-фазовой колонки и флуориметрического детектирования. В таблице 1 приведены производные сакситоксина и DC-сакситоксина, образующиеся при дериватизации перекисью водорода.

Издание официальное

Таблица 1 — Производные сакситоксина и DC-сакситоксина, образующиеся при дериватизации перекисью водорода

Токсин	Последовательность элюирования	Интенсивность аналитического сигнала	Характеристика продукта реакции
Сакситоксин	1	+	Продукт окисления № 1 DC-сакситоксина
	2	+	Продукт окисления № 2 DC-сакситоксина
	3	++	Продукт окисления сакситоксина
DC-сакситоксин	1	++	Продукт окисления № 1 DC-сакситоксина
	2	+	Продукт окисления № 2 DC-сакситоксина

Приведенный в настоящем стандарте метод пригоден для количественного определения сакситоксина и DC-сакситоксина. Однако следует принимать во внимание указанные ниже особенности.

Совместное присутствие в пробе различных паралитических токсинов может оказывать взаимное влияние на результат определения каждого из них в отдельности, поскольку при дериватизации различных токсинов частично могут образовываться одни и те же производные. Поэтому следует проявлять тщательность при интерпретации хроматограмм.

На результат определения сакситоксина не оказывает влияния присутствие в пробе других паралитических токсинов при дериватизации путем окисления перекисью водорода.

На результат определения DC-сакситоксина оказывает незначительное влияние присутствие сакситоксина, поскольку один из продуктов пероксидного окисления сакситоксина практически идентичен основному производному DC-сакситоксина (см. таблицу 1). Вклад производного сакситоксина, пик которого имеет то же время удерживания, что и пик основного производного DC-сакситоксина, в величину пика последнего составляет примерно 4 % ([4], [5]).

Токсины водорослей-динофлагеллятов GTX-2 и GTX-3 преобразуются при пероксидной дериватизации в такие же производные, а токсины GTX-1 и GTX-4 при этом не обнаруживаются. Периодатное окисление GTX-1, GTX-2, GTX-3 и GTX-4 приводит к образованию таких же производных. Токсины GTX-5 и нео-STX обнаруживаются только при периодатном окислении.

4 Реактивы

4.1 Общие положения

Для проведения анализа при отсутствии особо оговоренных условий используют только реактивы гарантированной аналитической чистоты и воду не ниже первой степени чистоты по EN ISO 3696.

Допускается использовать для градуировки аналитические стандарты токсинов других производителей, чем те, что указаны ниже, при условии их однозначной идентификации и точно установленной массовой доли основного вещества.

4.2 Метанол.

4.3 Ацетонитрил для ВЭЖХ.

4.4 Аммония формиат

4.4.1 Аммония формиат, раствор 1 молярной концентрации 0,3 моль/дм^3

Для приготовления раствора 18,9 г формиата аммония по 4.4 растворяют в воде, объем раствора доводят до 1 дм^3.

4.4.2 Аммония формиат, раствор 2 молярной концентрации 0,1 моль/дм^3

К 350 см^3 раствора аммония формиата 1 добавляют 700 см^3 воды. Значение pH полученного раствора доводят до 6 по индикаторной бумаге добавлением уксусной кислоты, после чего раствор фильтруют через мембранный фильтр по 5.15. Срок годности раствора — 2 дня.

4.5 Кислота соляная

4.5.1 Общие положения

Для приготовления растворов используют концентрированную соляную кислоту массовой долей ρ (HCl) = 25 %, определенной ацидиметрическим методом.

4.5.2 Кислота соляная, раствор молярной концентрации *c* (HCl) = 5 моль/дм^3 (раствор 1)

Для приготовления раствора 100 см^3 концентрированной соляной кислоты по 4.5.1 смешивают с 54 см^3 воды.

4.5.3 Кислота соляная, раствор молярной концентрации *c* (HCl) = 0,1 моль/дм^3 (раствор 2)

Для приготовления раствора 5 см^3 раствора соляной кислоты 1 по 4.5.2 смешивают с 245 см^3 воды.

4.6 Натрия гидроксид

4.6.1 Натрия гидроксид, раствор молярной концентрации *c* (NaOH) = 5 моль/дм^3 (раствор 1)

Для приготовления раствора 20 г гидроксида натрия по 4.6 растворяют в 100 см^3 воды.

4.6.2 Натрия гидроксид, раствор молярной концентрации *c* (NaOH) = 1 моль/дм^3 (раствор 2)

Для приготовления раствора 1 см^3 раствора гидроксида натрия 1 по 4.6.1 смешивают с 4 см^3 воды.

4.6.3 Натрия гидроксид, раствор молярной концентрации *c* (NaOH) = 0,1 моль/дм^3 (раствор 3)

Для приготовления раствора 1 см^3 раствора гидроксида натрия 2 по 4.6.2 смешивают с 9 см^3 воды.

4.7 Перекись водорода, раствор объемной долей 10 %

Для приготовления раствора 1 см^3 доступного для приобретения раствора перекиси водорода массовой долей 30 % смешивают с 2 см^3 воды. Срок годности раствора — 1 неделя при хранении в холодном темном месте.

4.8 Кислота периодная, раствор молярной концентрации *c* = 0,03 моль/дм^3

Для приготовления раствора 0,68 г периодной кислоты растворяют в 100 см^3 воды.

4.9 Натрий фосфорнокислый двухзамещенный, раствор молярной концентрации 0,3 моль/дм^3

Для приготовления раствора 0,53 г дигидрата двухзамещенного фосфата натрия растворяют в 10 см^3 воды.

4.10 Кислота уксусная с массовой долей основного вещества 100 %

4.10.1 Кислота уксусная, раствор молярной концентрации *c* = 1 моль/дм^3 (раствор 1)

Для приготовления раствора 57,2 см^3 уксусной кислоты по 4.10 разбавляют водой до объема 1 дм^3.

4.10.2 Кислота уксусная, раствор молярной концентрации *c* = 0,1 моль/дм^3 (раствор 2)

Для приготовления раствора 10 см^3 раствора уксусной кислоты 1 по 4.10.1 смешивают с 90 см^3 воды.

4.10.3 Кислота уксусная, раствор молярной концентрации *c* = 0,2 моль/дм^3 (раствор 3)

Для приготовления раствора 200 см^3 раствора уксусной кислоты 1 по 4.10.1 смешивают с 800 см^3 воды.

4.10.4 Кислота уксусная, раствор молярной концентрации *c* = 0,03 моль/дм^3 (раствор 4)

Для приготовления раствора 300 см^3 раствора уксусной кислоты 2 по 4.10.2 смешивают с 700 см^3 воды.

4.11 Гелий.

4.12 Реактив для пероксидной дериватизации

Для приготовления реактива к 400 мм^3 раствора перекиси водорода по 4.7 добавляют 4 см^3 раствора гидроксида натрия по 4.6.2, полученный раствор тщательно перемешивают. Раствор готовят в день использования.

4.13 Реактив для периодатной дериватизации

Для приготовления реактива смешивают одну объемную часть раствора периодной кислоты по 4.8 с одной объемной частью раствора двухзамещенного фосфата натрия по 4.9 и одной объемной частью раствора формиата аммония 1 по 4.4.1. Значение pH полученного раствора доводят до 8 по индикаторной бумаге путем добавления по каплям раствора гидроксида натрия 2 по 4.6.2. Реактив готовят в день проведения испытания непосредственно перед использованием.

4.14 Стандартные растворы сакситоксина

4.14.1 Основной раствор сакситоксина массовой концентрации $\rho = 1{,}0$ мкг/см^3

Готовят основной раствор сакситоксина массовой концентрации ρ = 1,0 мкг/см^3 в растворе уксусной кислоты 4 по 4.10.4 с использованием аналитических весов по 5.3. Срок годности основного раствора — не менее 5 мес при хранении в темноте при температуре примерно 4 °С (см. [6]).

Примечание — Ампульный препарат сакситоксина (STX · 2HCl) поставляется, например, «National Research Council of Canada», Галифакс, Канада (градуировочный комплект PSP-1)[1)].

4.14.2 Градуировочные растворы сакситоксина

Готовят несколько градуировочных растворов сакситоксина в диапазоне массовых концентраций от 0,05 до 0,30 мкг/см^3 путем разбавления основного раствора сакситоксина по 4.14.1 раствором уксусной кислоты 4 по 4.10.4. Градуировочные растворы готовят при проведении испытаний каждой серии проб.

4.15 Стандартные растворы DC-сакситоксина

4.15.1 Основной раствор DC-сакситоксина массовой концентрации $\rho = 1{,}0$ мкг/см^3

Готовят основной раствор DC-сакситоксина массовой концентрации ρ = 1,0 мкг/см^3 в растворе уксусной кислоты 4 по 4.10.4 с использованием аналитических весов по 5.3. Срок годности основного раствора — не менее 5 мес при хранении в темноте при температуре примерно 4 °С (см. [6]).

Примечание — Ампульный препарат DC-сакситоксина (DCSTX) поставляется, например, «National Research Council of Canada», Галифакс, Канада (градуировочный комплект PSP-1)[1)].

4.15.2 Градуировочные растворы DC-сакситоксина

Готовят несколько градуировочных растворов DC-сакситоксина в диапазоне массовых концентраций от 0,05 до 0,30 мкг/см^3 путем разбавления основного раствора DC-сакситоксина по 4.15.1 раствором уксусной кислоты 4 по 4.10.4. Градуировочные растворы готовят при проведении испытаний каждой серии проб.

4.16 Подвижная фаза для ВЭЖХ

4.16.1 Раствор формиата аммония

Раствор формиата аммония 2 по 4.4.2 перед использованием фильтруют через мембранный фильтр по 5.15 под вакуумом и дегазируют (например, при помощи гелия). Срок годности раствора — 2 дня при хранении в темноте при 4 °С.

4.16.2 Смесь ацетонитрила с раствором формиата аммония

Смешивают 50 см^3 ацетонитрила по 4.3 с 950 см^3 фильтрованного раствора формиата аммония по 4.16.1. При использовании смесь дегазируют (например, гелием). Срок годности смеси — 4 дня при хранении в темноте при 4 °С.

5 Оборудование и материалы

5.1 Общие положения

При проведении испытания используют обычное лабораторное оборудование, в частности, перечисленное ниже.

5.2 Измельчитель проб лабораторный.

5.3 Весы аналитические.

5.4 Пробирки центрифужные из полимерного материала вместимостью 40 см^3, снабженные обжимными пробками.

5.5 Ультрацентрифуга, обеспечивающая фактор разделения 35000 g.

5.6 Центрифуга, обеспечивающая фактор разделения 1950 g.

5.7 Пипетки пастеровские.

5.8 Пробирки стеклянные.

5.9 Бумага индикаторная универсальная для определения pH.

5.10 Устройство вакуумное многопозиционное для твердофазной экстракции (манифолд).

[1)] Данная информация приведена исключительно для удобства применения настоящего стандарта и не является рекламной поддержкой CEN указанного изделия. Допускается использовать аналогичные изделия при условии, что они обеспечивают сопоставимость результатов.

5.11 Колонки для твердофазной экстракции объемом 1 см^3, содержащие 100 мг обращенно-фазового сорбента (C_{18})

Колонки необходимо протестировать на полноту элюирования из них сакситоксина.

5.12 Пипетки автоматические объемом дозирования 20, 100 и 1000 мм^3.

5.13 Сосуды из полимерного материала для автосамплера жидкостного хроматографа (позиция, не обязательная к применению) для проведения в них автоматической дериватизации по 6.4.1 объемом не менее 600 мм^3, снабженные обжимными пробками с прокладкой.

5.14 Система для ВЭЖХ

5.14.1 Инжектор.

5.14.2 Детектор флуориметрический, пригодный для проведения измерений при длине волны возбуждения 340 нм и длине волны эмиссии 400 нм.

5.14.3 Интегратор.

5.14.4 Насос для ВЭЖХ, пригодный для работы в режиме бинарного градиентного элюирования.

5.14.5 Колонка для ВЭЖХ аналитическая длиной 200 мм, внутренним диаметром 3 мм, заполненная обращенно-фазовым сорбентом, например C_{18}-ODS-Hypersil[1)], или аналогичная.

5.15 Фильтры мембранные для водных растворов с диаметром пор 0,45 мкм.

5.16 Флакон из полимерного материала вместимостью 1,5 см^3 для проведения дериватизации.

5.17 Фильтры складчатые.

5.18 Цилиндр мерный вместимостью 50 см^3.

5.19 Пробирка градуированная с взаимозаменяемым конусом вместимостью 5 см^3.

6 Процедура проведения испытания

6.1 Подготовка пробы

При необходимости пробу размораживают. Раковины ополаскивают водопроводной водой для удаления песка, после чего пробу выдерживают некоторое время для стекания избыточной влаги. Мякоть моллюсков извлекают из раковин. Примерно 100 г мякоти моллюсков измельчают в гомогенизаторе по 5.2. В случае если непосредственно после подготовки пробы не предполагается проводить испытание, ее замораживают.

6.2 Экстракция

6.2.1 Общие положения

Приведенный в настоящем стандарте метод предполагает возможность выбора между экстракцией уксусной и соляной кислотами (см. «Введение»). Выбор аналитика в данном случае зависит от цели испытания.

6.2.2 Экстракция соляной кислотой

Из размороженной гомогенизированной лабораторной пробы отбирают в стакан пробу для анализа массой 25 г, взвешенной с точностью до 0,1 г (G_m, см. раздел 10). В стакан добавляют 25 см^3 раствора соляной кислоты 2 по 4.5.3 и 3 капли раствора соляной кислоты 1 по 4.5.2. Содержимое стакана перемешивают с помощью магнитной мешалки, после чего проверяют значение pH полученной смеси по индикаторной бумаге по 5.9, которое должно находиться в интервале от 2,5 до 3,0. При необходимости значение pH корректируют способом, описанным в следующем абзаце.

Полученную смесь нагревают до кипения и аккуратно кипятят в течение 5 мин, после чего охлаждают до комнатной температуры. Значение pH охлажденной смеси доводят до 2,5—3,0. Для повышения значения pH в смесь добавляют по каплям раствор гидроксида натрия 3 по 4.6.3 при перемешивании. Для понижения значения pH в смесь добавляют по каплям раствор соляной кислоты 1 по 4.5.2 при постоянном перемешивании. Смесь переносят в мерный цилиндр по 5.18, после чего объем содержимого цилиндра доводят водой до 50 см^3 (V_t, см. раздел 10).

Если после кипячения образуется гель, смесь переносят в центрифужные пробирки по 5.4, заполняя их не выше, чем на 2 см от края. При этом обращают внимание на то, чтобы разница в массе пробирок не превышала 0,03 г. Содержимое пробирок центрифугируют на ультрацентрифуге по 5.5 при факторе разделения 35000 g в течение 30 мин.

[1)] Данная информация приведена исключительно для удобства применения настоящего стандарта и не является рекламной поддержкой CEN указанного изделия. Допускается использовать аналогичные изделия при условии, что они обеспечивают сопоставимость результатов.

Если после кипячения гель не образуется, смесь переносят в стеклянные пробирки по 5.8, заполняя их не выше, чем на 2 см от края. При этом обращают внимание на то, чтобы разница в массе пробирок не превышала 0,1 г. Содержимое пробирок центрифугируют на центрифуге по 5.6 при факторе разделения 1950 g в течение 15 мин.

Если не предполагается переходить к последующим этапам испытания непосредственно после получения экстракта, его допускается хранить в темноте при температуре примерно 4 °С в течение не более чем 5 сут.

Примечание — При хранении экстракта более 5 сут возникает вероятность развития в нем плесневых грибов.

6.2.3 Экстракция уксусной кислотой

Из размороженной гомогенизированной лабораторной пробы отбирают в стакан пробу для анализа массой 25 г, взвешенной с точностью до 0,1 г (G_m, см. раздел 10). В стакан добавляют 25 см^3 раствора уксусной кислоты 3 по 4.10.3. Содержимое стакана перемешивают в течение 10 мин с помощью магнитной мешалки, после чего проверяют значение pH полученной смеси по индикаторной бумаге, которое должно находиться в интервале от 3 до 5. При необходимости значение pH корректируют добавлением по каплям раствора соляной кислоты 1 по 4.5.2 при постоянном перемешивании. Смесь переносят в мерный цилиндр по 5.18, после чего объем содержимого цилиндра доводят водой до 50 см^3 (V_t, см. раздел 10). Полученную смесь полностью фильтруют через складчатый фильтр по 5.17.

Если не предполагается переходить к последующим этапам испытания непосредственно после получения экстракта, его допускается хранить в темноте при температуре примерно 4 °С в течение не более чем 5 сут.

Примечание — При хранении экстракта более 5 сут возникает вероятность развития в нем плесневых грибов.

6.3 Очистка экстракта

Колонку для твердофазной экстракции по 5.11 устанавливают в вакуумный манифолд по 5.10, в котором затем создают небольшое разрежение. Колонку последовательно промывают 3 см^3 метанола по 4.2, 3 см^3 воды и 1,5 см^3 раствора соляной кислоты 2 по 4.5.3 или раствора уксусной кислоты 3 по 4.10.3, сообразно с примененным способом экстракции. При этом важно не допускать попадания воздуха в слой сорбента. Затем устраняют разрежение в манифолде и устанавливают под колонку пробирку по 5.19, после чего снова создают разрежение. Аликвоту экстракта, полученного по 6.2.2 или 6.2.3, объемом 0,5 см^3 (V_m, см. раздел 10) пропускают через колонку, элюат собирают в пробирку по 5.19. При этом также важно не допускать попадания воздуха в слой сорбента.

Через колонку пропускают 2,0 см^3 воды, элюат собирают в ту же пробирку, при этом добиваются полного выхода жидкости из колонки вплоть до осушения слоя сорбента. После этого устраняют разрежение в манифолде и извлекают из него пробирку с элюатом.

Объем элюата в пробирке доводят до 3,0 см^3 водой (V_e, см. раздел 10), содержимое пробирки тщательно перемешивают. Полученный раствор представляет собой очищенный экстракт пробы массовой концентрации аналита ρ_m (см. раздел 10).

Сакситоксин нестабилен при pH выше 7, поэтому важно проводить дериватизацию по 6.4.3 непосредственно после добавления раствора гидроксида натрия. Если предполагается переходить к последующим этапам испытания позднее, рекомендуется законсервировать очищенный экстракт до добавления в него раствора гидроксида натрия.

6.4 Дериватизация

6.4.1 Общие положения

При пероксидном окислении чувствительность определения сакситоксина и DC-сакситоксина выше, чем при периодатном окислении, поэтому предпочтительнее пероксидная дериватизация с флуориметрическим детектированием. Периодатное окисление используют только в тех случаях, когда существует особая необходимость подтверждения присутствия сакситоксина в пробе. Отклик детектора, регистрируемый по площади пика, при периодатном окислении сакситоксина составляет обычно половину отклика детектора при пероксидной дериватизации. Вместе с тем, в случае присутствия в пробе токсина GTX-6 и нео-сакситоксина, при пероксидной дериватизации их пики могут оказаться в непосредственной близости от пика основного производного сакситоксина.

Допускается использовать системы для автоматизированной дериватизации, преимуществом которых является возможность проведения дериватизации как градуировочных растворов, так и

растворов проб при абсолютно одинаковых условиях. Дериватизацию следует проводить в подходящем сосуде из полимерного материала. В зависимости от используемого оборудования продолжительность дериватизации может составлять немногим более трех минут.

6.4.2 Пероксидная дериватизация

Во флакон по 5.16 вносят 275 мм^3 реактива для пероксидной дериватизации по 4.12 и 100 мм^3 очищенного экстракта из пробы по 6.3 или такой же объем градуировочного раствора, содержимое флакона перемешивают и выдерживают 3 мин при 20 °С для прохождения реакции. Реакцию прекращают добавлением 20 мм^3 уксусной кислоты по 4.10, содержимое флакона тщательно перемешивают. Полученный раствор используют непосредственно для хроматографического анализа при объеме инжекции 20 мм^3.

6.4.3 Периодатная дериватизация

Отбирают 1 см^3 экстракта из пробы после очистки по 6.3 и доводят значение его pH до 8,0 по индикаторной бумаге путем добавления с помощью автоматической пипетки от 25 до 30 мм^3 раствора гидроксида натрия по 4.6.2, после чего раствор тщательно перемешивают. Корректировку значения pH экстракта из пробы проводят непосредственно перед проведением дериватизации. Оставшиеся 2 см^3 экстракта из пробы после очистки сохраняют для возможного проведения повторных испытаний.

Во флакон по 5.16 пипеткой вносят 500 мм^3 реактива для периодатной дериватизации по 4.13 и 100 мм^3 экстракта из пробы после корректировки его pH или такой же объем градуировочного раствора. Полученную смесь выдерживают 3 мин при 20 °С для прохождения реакции. Реакцию прекращают добавлением 10 мм^3 уксусной кислоты по 4.10, содержимое флакона тщательно перемешивают. Полученный раствор используют для хроматографического анализа при объеме инжекции 20 мм^3.

7 Проведение измерений методом ВЭЖХ

Перед проведением измерений систему для ВЭЖХ подготавливают к работе и добиваются установления стабильных условий хроматографических измерений. Для проверки стабильности работы системы для ВЭЖХ проводят хроматографический анализ одного градуировочного раствора в двух или трех повторностях и сравнивают друг с другом полученные значения времени удерживания и площади пика. Система для ВЭЖХ работает стабильно, если площади пика аналита на хроматограммах, полученных непосредственно одна за другой, отличаются друг от друга не более чем на 6 %.

При выполнении серии испытаний проверяют стабильность градуировочной характеристики, для чего время от времени проводят хроматографический анализ одного и того же градуировочного раствора. Если площади пика аналита на этих хроматограммах отличаются друг от друга более чем на 6 %, градуировочная характеристика считается нестабильной. В этом случае следует провести проверку исправности системы для ВЭЖХ. Результаты испытаний, полученные за этот период, следует считать недостоверными.

В качестве компонентов подвижной фазы используют раствор формиата аммония по 4.16.1 и смесь раствора формиата аммония с ацетонитрилом по 4.16.2.

Хроматографический анализ проводят при скорости подвижной фазы 0,75 см^3/мин и градиентном элюировании в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 — Градиентное элюирование при скорости подачи подвижной фазы 0,75 см^3/мин

Время с момента инжекции, мин	Объемная доля смеси ацетонитрила с формиатом аммония по 4.16.2 в подвижной фазе, %
0	0
2	0
17	100
19	100
20	0

Флуориметрическое детектирование осуществляют при длине волны возбуждения 340 нм и длине волны эмиссии 400 нм.

Хроматографический анализ растворов проб и градуировочных растворов проводят при одинаковых объемах инжекции, равных 20 мм^3.

Перед анализом серии растворов проб проводят анализ не менее четырех градуировочных растворов с различными массовыми концентрациями аналита по 4.14.2 и 4.15.2. Также в промежутках между анализами растворов проб время от времени проводят анализ одного и того же градуировочного раствора для оценки стабильности градуировочной характеристики. Например, каждым четвертым анализом проводят анализ градуировочного раствора. По окончании анализа серии растворов проб проводят повторный анализ серии градуировочных растворов.

Если массовая концентрация сакситоксина в растворе пробы для анализа превышает верхнюю границу диапазона градуировки, раствор пробы для анализа разбавляют водой так, чтобы площадь пика производного сакситоксина находилась в пределах диапазона градуировки.

8 Установление градуировочной характеристики

Градуировку проводят в начале каждого рабочего дня, а также в случае возможного изменения условий хроматографического анализа. Для построения градуировочного графика в системе координат откладывают значения высоты или площади пика аналита на хроматограммах градуировочных растворов против соответствующих значений массовой концентрации аналита в градуировочных растворах. Проверяют линейность градуировочной функции (см. [7]). Градуировочный график используют для расчета массовой концентрации сакситоксина и DC-сакситоксина в растворе пробы для анализа.

9 Идентификация аналита

Пики производных сакситоксина и DC-сакситоксина на хроматограмме раствора пробы идентифицируют по совпадению их времени удерживания с временем удерживания пиков производных сакситоксина и DC-сакситоксина на хроматограммах градуировочных растворов. При необходимости повышения надежности идентификации проводят хроматографический анализ раствора пробы с добавкой градуировочного раствора.

10 Обработка результатов

Содержание сакситоксина или DC-сакситоксина в пробе w, мг/кг, рассчитывают по формуле

$$w = \frac{V_e \rho_m V_t}{G_m V_m}, \quad (1)$$

где V_e — объем экстракта из пробы после очистки методом твердофазной экстракции по 6.3, см^3;

ρ_m — массовая концентрация сакситоксина или DC-сакситоксина в растворе пробы для анализа по 6.3, найденная по градуировочному графику, мкг/см^3;

V_t — суммарный объем пробы и экстрагента при экстракции соляной кислотой по 6.2.2 или уксусной кислотой по 6.2.3, см^3;

G_m — масса пробы для анализа, г;

V_m — объем аликвоты экстракта из пробы, использованный для очистки методом твердофазной экстракции по 6.3, см^3.

11 Прецизионность

В приложении А приведены результаты межлабораторных испытаний по оценке прецизионности и правильности метода применительно к мидиям [4], [5], а также результаты испытаний, проведенных при аттестации образцов сравнения сакситоксина и DC-сакситоксина в мидиях [8].

12 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать:

- всю информацию, необходимую для идентификации пробы (вид пробы, ее происхождение и наименование);
- использованный метод испытания со ссылкой на настоящий стандарт;
- дату и метод отбора пробы (если он известен);
- дату поступления пробы в лабораторию;
- дату проведения испытания;
- результаты испытания с указанием единиц измерения;
- все особенности, наблюдавшиеся при проведении испытания;
- все операции, не оговоренные в методике или рассматриваемые как необязательные, которые могли повлиять на результат испытания.

Приложение А
(справочное)

Данные по прецизионности методики

Приведенные в таблице А.1 данные получены в результате межлабораторных испытаний (см. [4] и [5]), а также испытаний, проведенных при аттестации образцов сравнения сакситоксина и DC-сакситоксина в мидиях [8]. При аттестационных испытаниях образцов сравнения была применена экстракция уксусной кислотой.

Таблица А.1 — Данные по прецизионности методики

Год	Вид испытаний	Метрологическая характеристика	Токсин	Содержание (массовая доля) аналита в пробе, мг/кг ($млн^{-1}$)	Полученное значение метрологической характеристики	Примечание
1994	Межлабораторные испытания	Повторяемость	Сакситоксин	0,5	C_v^* = 1 %	—
1994	Межлабораторные испытания	Повторяемость	DC-сакситоксин	1,5	C_v = 5 %	—
1994	Межлабораторные испытания	Полнота обнаружения	Сакситоксин и DC-сакситоксин	0,4	От 89 % до 106 %	—
1996	Аттестационные испытания	Повторяемость (в один и тот же день)	Сакситоксин	0,5	C_v = 0,6 %—6 %	5 лабораторий
1996	Аттестационные испытания	Повторяемость (в различные дни)	Сакситоксин	0,5	C_v = 1 %—28 %	5 лабораторий
1996	Аттестационные испытания	Воспроизводимость	Сакситоксин	0,5	C_v = 15 %	5 лабораторий
1996	Аттестационные испытания	Повторяемость (в один и тот же день)	DC-сакситоксин	1,6	C_v = 2 %—5 %	5 лабораторий
1996	Аттестационные испытания	Повторяемость (в различные дни)	DC-сакситоксин	1,6	C_v = 2 %—5 %	5 лабораторий
1996	Аттестационные испытания	Воспроизводимость	DC-сакситоксин	0,5	C_v = 12 %	5 лабораторий
1996	Аттестационные испытания	Полнота обнаружения	Сакситоксин	0,4	От 79 % до 106 %	5 лабораторий
1996	Аттестационные испытания	Полнота обнаружения	DC-сакситоксин	0,4	От 80 % до 102 %	5 лабораторий
* C_v — коэффициент вариации (относительное стандартное отклонение).						

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным европейским региональным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение и наименование европейского регионального стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
EN ISO 3696 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний	—	*
* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его утверждения рекомендуется использовать перевод на русский язык данного европейского регионального стандарта. Перевод данного европейского регионального стандарта находится в Федеральном информационном фонде технических регламентов и стандартов.		

Библиография

[1] J.F. Lawrence und C. Ménard: Liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish after prechromatographic oxidation., J.Assoc.Off.Anal.Chem, 1991, vol.74, no 6, p 1006 — 1012

[2] Egmond, H.P. van, Top, H.J. van den, Paulsch, W.E., Goenaga, X., und Vieytes, M.R.: Paralytic Shellfish Poison reference materials: an intercomparison of methods for the determination of Saxitoxin.. Food Addit. Contam, 1994, 11, 39—56

[3] Top, H.J. van den, Boenke, A., Burdaspal, P.A., Bustos, J., Van Egmond, H.P., Legarda, T., Mesego, A., Mouriño, A., Paulsch, W.E., und Salgado, C.: The development of reference materials for paralytic shellfish poisoning toxins in lyophilized mussel, I: Interlaboratory studies of methods of analysis., Food Addit. Contam. 2000, 17, 419—433

[4] Top, H.J. van den (1994), Results second intercomparison for lab 20 for PSP in Mussel. Internal report. RIVM, 1998, Bilthoven, The Netherlands

[5] H.J. van den Top: Results certification study for Lab 20 for PSP in Mussel. Internal report. RIVM, 1996, Bilthoven, The Netherlands

[6] Top, H.J. van den: Stability of reference solutions during the intercomparison study of PSP in Mussel, Spring 1995. Internal report relative to study plan 1.1995.10. (In Dutch). RIVM, Bilthoven, The Netherlands

[7] Van Trijp, J.M.P. und Roos, A.H.: Model for the calculation of calibration curves. RIKILT — Report 91.02 January 1991. Wageningen, The Netherlands

[8] Egmond, H.P. van, Mouriño, A., Burdaspal, P.A., Bustos, J., Legarda, T., Mesego, A., Paulsch, W.E., Salgado, C., Top, H.J. van den, und Boenke, A.: The certification of the mass fractions of saxitoxin and dc-Saxitoxin in two mussel reference materials (CRMs 542 & 543) including the identification of other PSP-toxins and a spiking procedure based on an enrichment-solution (CRM 663) with a certified mass concentration of Saxitoxin. Report EUR 18318 EN. 1998, 124 pp. European Commission, Directorate-General Science, Research and Development, Brussels, Belgium

УДК 664:543.544.5.068.7:006.354 МКС 67.120.30 IDT

Ключевые слова: пищевые продукты, мидии, сакситоксин, DC-сакситоксин, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, предколоночная дериватизация, пероксидное окисление, периодатное окисление, паралитические токсины моллюсков, экстракция

Редактор *Л.И. Нахимова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *О.В. Лазарева*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 19.01.2016. Подписано в печать 18.02.2016. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,98. Тираж 34 экз. Зак. 504.

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

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

gost.e-ecolog.ru