МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33287— 2015

ВИНО И ВИНОМАТЕРИАЛЫ

Определение содержания охратоксина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

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 РАЗРАБОТАН Обществом с ограниченной ответственностью «Люмэкс-маркетинг» (ООО «Люмэкс-маркетинг»)

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

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 18 июня 2015 г. № 47)

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
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 21 июля 2015 г. № 948-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33287–2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2017 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

© 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

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

ВИНО И ВИНОМАТЕРИАЛЫ

Определение содержания охратоксина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Wine and wine materials.
Determination of ochratoxin A content by high performance liquid chromatography

Дата введения – 2017–01–01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на вино и виноматериалы и устанавливает метод определения массовой концентрации охратоксина А при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее – ВЭЖХ).

Диапазон измерений массовой концентрации охратоксина А составляет от 0,001 до 0,1 мг/дм^3.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004–91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007–76 Система стандартов безопасности труда. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.010–76 Система стандартов безопасности труда. Взрывобезопасность. Общие требования

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

ГОСТ 61–75 Кислота уксусная. Технические условия

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

ГОСТ ISO 3696–2013 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля

ГОСТ 4233–77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4204–77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ ИСО 5725-6–2003[1)] Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9293–74 (ИСО 2435–73) Азот газообразный и жидкий. Технические условия

ГОСТ 16317–87 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ ИСО/МЭК 17025–2009 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные. Типы. Основные параметры и размеры

ГОСТ 29227–91 (ИСО 835-1–81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 31730–2012 Продукция винодельческая. Правила приемки и методы отбора проб

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

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

[1)] 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».

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 Отбор и подготовка пробы к испытанию

Отбор проб по ГОСТ 31730.

Вина с повышенным содержанием диоксида углерода предварительно дегазируют. Для этого 50 $см^3$ продукта помещают в колбу с тубусом вместимостью 100 $см^3$ (см. 6.22), встряхивают и подключают к вакуумному насосу (см. 6.6). Дегазируют в течение 10–15 мин до исчезновения пены и появления больших пузырей на поверхности жидкости.

4 Требования безопасности

При проведении измерений следует соблюдать требования:

- электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019 и технической документации на хроматограф;
- взрывобезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.010;
- пожарной безопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.004;
- безопасности при работе с вредными веществами в соответствии с ГОСТ 12.1.007.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ – Охратоксин А вызывает поражение почек и печени и предположительно является канцерогеном. Все работы, связанные с подготовкой пробы и приготовлением растворов охратоксина А, следует проводить в вытяжном шкафу с использованием защитной одежды, перчаток и защитных очков. Деконтаминацию стеклянной посуды, контактировавшей с охратоксином А, проводят 4 %-ным раствором гипохлорита натрия.

5 Сущность метода

Метод основан на экстракции охратоксина А из пробы подкисленным хлористым метиленом, концентрировании полученного экстракта, скрининге проб и определении массовой концентрации охратоксина А с применением ВЭЖХ на обращенно-фазовой колонке с флуориметрическим детектированием.

6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, стандартные образцы, реактивы, посуда и материалы

6.1 Хроматограф жидкостный с флуориметрическим или спектрофлуориметрическим детектором, обеспечивающим возбуждение флуоресценции в спектральной области (330 ± 20) нм и регистрацию интенсивности флуоресценции в спектральной области (465 ± 20) нм. Применяемый детектор должен обеспечивать предел обнаружения охратоксина А не более 5 $нг/см^3$.

6.2 Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,01 г.

6.3 Колонка хроматографическая аналитическая, заполненная обращенно-фазовым сорбентом с размером частиц 5 мкм, имеющая эффективность не менее 5000 теоретических тарелок по пику охратоксина А[1)].

6.4 Предколонка того же внутреннего диаметра и заполненная тем же обращенно-фазовым сорбентом, что и аналитическая колонка.

6.5 Испаритель ротационный, снабженный водяной баней с регулятором температуры в диапазоне от 20 °С до 50 °С.

6.6 Насос лабораторный вакуумный, мембранный или водоструйный по ГОСТ 25336, обеспечивающий разрежение от 2,5 до 10 кПа.

[1)] Пример коммерческого продукта, удовлетворяющего указанным требованиям, – хроматографическая колонка внутренним диаметром 2,1 мм и длиной 120 мм, заполненная обращенно-фазовым сорбентом Кромасил С-18, Alltima C18 и др. с размером частиц 5 мкм, снабженная предколонкой длиной 25 мм. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является поддержкой указанного продукта.

6.7 Шкаф сушильный, обеспечивающий температуру до 200 °С.

6.8 Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

6.9 Центрифуга лабораторная с частотой вращения не менее 5000 об/мин.

6.10 Межгосударственный или метрологически обеспеченный в национальной системе измерений государства, принявшего стандарт, государственный стандартный образец[1)] состава раствора охратоксина А в ацетонитриле массовой концентрации 50 мкг/см^3 с погрешностью аттестованного значения не более ± 2,5 мкг/см^3. Допускается применение стандартных образцов состава раствора охратоксина А в других растворителях, что должно быть учтено при приготовлении исходного раствора по 7.3.1.

6.11 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или вода для лабораторного анализа степени чистоты 1 по ГОСТ ISO 3696.

6.12 Кислота уксусная по ГОСТ 61, ледяная.

6.13 Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, оптическая плотность относительно дистиллированной воды при 200 нм не более 0,025, массовая доля воды не более 0,03 %.

6.14 Хлористый метилен для высокоэффективной жидкостной хроматографии по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

6.15 Кислота серная по ГОСТ 4204, х. ч. или ч. д. а.

6.16 Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.

6.17 Пипетки градуированные 1-2-2-1, 1-2-2-2, 1-2-2-5, 1-2-2-10 или других типов и исполнений по ГОСТ 29227.

6.18 Цилиндры мерные 1-25-2, 1-50-2, 1-250-2 или других исполнений по ГОСТ 1770.

6.19 Колбы мерные 2-25-2, 2-50-2, 2-100-2, 2-500-2 по ГОСТ 1770.

6.20 Колбы остродонные О-10-14/23 и О-50-14/23 по ГОСТ 25336.

6.21 Колбы плоскодонные П-1-50-29/32, П-1-100-29/32, П-1-200-29/32, П-1-250-29/32 или Кн-1-50-29/32, Кн-1-100-29/32, Кн-1-250-29/32 по ГОСТ 25336.

6.22 Колбы с тубусом 2-100-19/26, 2-250-29/32 по ГОСТ 25336.

6.23 Воронки делительные типа ВД исполнений 1 или 3 вместимостью 50 см^3 по ГОСТ 25336.

6.24 Воронки лабораторные типа В по ГОСТ 25336.

6.25 Фильтры бумажные «красная лента» по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

6.26 Стеклянные емкости вместимостью 25, 50, 250, 1000 см^3 с пришлифованными стеклянными, фторопластовыми или полиэтиленовыми пробками по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

6.27 Часы песочные или таймер по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками не хуже вышеуказанных и вспомогательного оборудования, реактивов и материалов с техническими характеристиками не хуже вышеуказанных.

7 Подготовка к проведению испытания

7.1 Подготовка стеклянной посуды

Посуду для приготовления и хранения подвижной фазы обрабатывают только серной кислотой по 6.15 без применения других моющих средств, тщательно промывают водопроводной водой и ополаскивают дистиллированной водой.

Остальную стеклянную посуду обрабатывают горячей водой с моющим средством, тщательно ополаскивают дистиллированной водой и сушат в сушильном шкафу при температуре 105 °С.

7.2 Приготовление вспомогательных растворов

7.2.1 Приготовление подвижной фазы

В заранее подготовленную стеклянную емкость вместимостью 1000 см^3 с плотно закрывающейся пришлифованной стеклянной, фторопластовой или полиэтиленовой пробкой помещают 5 см^3 ледяной уксусной кислоты (см. 6.12), 215 см^3 ацетонитрила (см. 6.13) и 280 см^3 дистиллированной воды. Смесь тщательно перемешивают. При хранении подвижной фазы недопустимо использование резиновых или корковых пробок.

Срок хранения смеси при комнатной температуре – не более 1 мес.

Перед применением подвижную фазу дегазируют и фильтруют в соответствии с рекомендациями изготовителя хроматографа.

[1)] В Российской Федерации – стандартный образец утвержденного типа.

7.2.2 Приготовление смеси хлористого метилена и уксусной кислоты в объемном соотношении 200:1

В плоскодонную колбу вместимостью 250 см^3 помещают 200 см^3 хлористого метилена (см. 6.14) и 1,0 см^3 ледяной уксусной кислоты (см. 6.12).

Срок хранения смеси при комнатной температуре в стеклянной емкости с пришлифованной стеклянной, фторопластовой или полиэтиленовой пробкой – не более 1 мес.

7.2.3 Приготовление раствора хлористого натрия с массовой долей 20 %.

В плоскодонную колбу вместимостью 200 см^3 помещают 20 г хлористого натрия (см. 6.16), приливают 80 см^3 дистиллированной воды, тщательно перемешивают.

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

7.3 Приготовление растворов охратоксина А

7.3.1 Приготовление исходного раствора охратоксина А с номинальным значением массовой концентрации 1 мкг/см^3

Пипеткой отбирают 1 см^3 стандартного образца состава раствора охратоксина А в ацетонитриле массовой концентрации 50 мкг/см^3 (см. 6.10), помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят объем до метки ацетонитрилом (см. 6.13).

Срок хранения приготовленного раствора в холодильнике при температуре от 2 °С до 6 °С – не более 6 мес.

Фактическое значение массовой концентрации охратоксина А в исходном растворе ($C_{исх}$, мкг/см^3) вычисляют по формуле

$$C_{исх} = \frac{C_{СО} \cdot V_{СО}}{V_{исх}}, \quad (1)$$

где $C_{СО}$ – аттестованное значение массовой концентрации охратоксина А в стандартном образце по паспорту, мкг/см^3;

$V_{СО}$ – объем стандартного образца состава раствора охратоксина А, отобранный для приготовления исходного раствора, см^3 (1 см^3);

$V_{исх}$ – объем мерной колбы, использованной для приготовления исходного раствора, см^3 (50 см^3).

Примечание – При использовании стандартного образца состава раствора охратоксина А в других растворителях аликвоту (1 см^3) упаривают до сухого остатка в вакууме при температуре водяной бани от 40 °С до 45 °С или в токе азота. Сухой остаток растворяют в 2 см^3 ацетонитрила и перемешивают в течение 1 мин. Затем полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и разбавляют до метки ацетонитрилом.

7.3.2 Приготовление раствора охратоксина А в подвижной фазе с номинальным значением массовой концентрации 50 нг/см^3

В мерную колбу вместимостью 50 см^3 помещают 2,5 см^3 исходного раствора охратоксина А по 7.3.1 и доводят объем до метки подвижной фазой по 7.2.1.

Срок хранения полученного раствора в холодильнике при температуре от 2 °С до 6 °С – не более 3 мес.

Фактическое значение массовой концентрации охратоксина А в растворе (C_0, нг/см^3) вычисляют по формуле

$$C_0 = \frac{C_{исх} \cdot V_{исх}}{V_0} \cdot 1000, \quad (2)$$

где $C_{исх}$ – фактическое значение массовой концентрации охратоксина А в исходном растворе (см. 7.3.1), мкг/см^3;

$V_{исх}$ – объем исходного раствора по 7.3.1, отобранный для приготовления данного раствора, см^3 (2,5 см^3);

V_0 – объем мерной колбы, использованной для приготовления исходного раствора, см^3 (50 см^3);

1000 – коэффициент согласования размерности единиц массы.

7.3.3 Приготовление градуировочных растворов охратоксина А

Исходный раствор охратоксина А в ацетонитриле по 7.3.1 помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3. Объем раствора охратоксина А должен соответствовать требованиям таблицы 1.

Таблица 1

Номер раствора	Объем исходного раствора по 7.3.1, $см^3$	Номинальное значение массовой концентрации, $нг/см^3$
1	5,0	100
2	2,0	40
3	1,0	20
4	0,5	10
5	0,25	5

Содержимое колбы разбавляют до метки подвижной фазой по 7.2.1 в соответствии с таблицей 1.

Срок хранения градуировочных растворов в холодильнике при температуре от 2 °С до 6 °С – не более семи дней.

Примечание – При необходимости, например для внесения добавки охратоксина А в пробу (см. 8.2), допускается приготовление аналогичным способом растворов охратоксина А других концентраций.

Фактическое значение массовой концентрации охратоксина А в градуировочных растворах вычисляют по формуле (2), исходя из значений объемов исходного раствора по таблице 1.

Перед использованием растворы выдерживают до достижения комнатной температуры.

7.4 Подготовка хроматографа

Подготовку хроматографа к измерениям проводят в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации.

Устанавливают рабочие длины волн возбуждения и регистрации флуоресценции (см. 6.1). Объемную скорость подачи подвижной фазы и объем дозирования пробы задают в зависимости от типоразмеров колонки, руководствуясь указаниями изготовителя хроматографа и колонки. Например, для хроматографической колонки, приведенной в 6.3, рекомендуются значение объемной скорости 200 $мм^3$/мин и объем петли крана-дозатора от 10 до 20 $мм^3$. При наличии термостата колонок устанавливают температуру (25 ± 1) °С.

7.5 Градуировка хроматографа

Диапазон линейности градуировочной характеристики составляет от 5 до 100 $нг/см^3$. В качестве образцов для градуировки хроматографа используют градуировочные растворы охратоксина А по 7.3.3.

Регистрируют по две хроматограммы каждого градуировочного раствора и, используя программное обеспечение к хроматографу, проводят градуировку хроматографа, устанавливая параметры градуировочной характеристики и время удерживания охратоксина А.

Рассчитывают коэффициент корреляции и отклонения рассчитанных значений массовой концентрации охратоксина А в каждой градуировочной точке от фактического значения в соответствии с процедурой приготовления градуировочных растворов (см. 7.3.3).

Градуировку считают приемлемой, если:

- коэффициент корреляции не менее 0,998;
- относительное отклонение рассчитанного значения массовой концентрации охратоксина А от фактического значения не более ± 10 %.

7.6 Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят ежедневно перед началом работы.

В качестве контрольного раствора используют раствор охратоксина А в подвижной фазе, приготовленный аналогично 7.3.3. Массовую концентрацию охратоксина А в контрольном растворе выбирают, исходя из предполагаемого содержания охратоксина А в испытуемых пробах; рекомендуется использование раствора охратоксина А массовой концентрации 20 $нг/см^3$.

Регистрируют не менее двух хроматограмм контрольного раствора и идентифицируют пик охратоксина А по времени удерживания при ширине окна идентификации 5 %, внося при необходимости программную коррекцию времени удерживания пика, и при помощи градуировочной характеристики рассчитывают массовую концентрацию охратоксина А для каждого ввода.

Повторяемость значений времени удерживания и значений массовой концентрации охратоксина А проверяют по формулам

$$\frac{|t_1 - t_2|}{\bar{t}} \le 0{,}05, \qquad (3)$$

где t_1 и t_2 – значения времени удерживания пика охратоксина А на первой и второй хроматограммах соответственно, мин;

$\bar{t}$ – среднеарифметическое значение t_1 и t_2, мин.

$$\frac{C_{K1} - C_{K2}}{\overline{C_K}} \le 0{,}07, \quad (4)$$

где C_{K1} и C_{K2} – массовые концентрации охратоксина А в контрольном растворе по первой и второй хроматограммам соответственно, нг/см^3;

$\overline{C_K}$ – среднеарифметическое значений C_{K1} и C_{K2}, нг/см^3.

Градуировочная зависимость признается стабильной, если выполняется условие

$$\frac{\overline{C_K} - C}{C} \le 0{,}12, \quad (5)$$

где C – фактическое значение массовой концентрации охратоксина А в контрольном растворе, нг/см^3.

Если условие (5) не выполняется, то процедуру контроля повторяют. Результаты повторного контроля считают окончательными, и градуировку хроматографа по 7.5 проводят заново.

7.7 Контроль холостой пробы

Испытание холостой пробы проводят перед испытанием исследуемых проб.

В колбу для упаривания помещают 15 см^3 смеси хлористого метилена и уксусной кислоты по 7.2.2 и упаривают в вакууме до сухого остатка, поместив колбу в водяную баню при температуре от 40 °С до 45 °С.

Сухой остаток растворяют в 0,5 см^3 подвижной фазы по 7.2.1, выдерживают не менее 5 мин и проводят хроматографический анализ полученного концентрата по 8.3. Если на хроматограмме присутствуют пики, по времени удерживания близкие к пику охратоксина А, то находят и устраняют причины загрязнения холостой пробы.

Примечание – Наиболее распространенной причиной неудовлетворительного результата контроля холостой пробы является недостаточная чистота хлористого метилена, который может быть загрязнен примесями, имеющими близкие к охратоксину А значения времени удерживания. Такой хлористый метилен необходимо заменить или подвергнуть тщательной перегонке, собирая среднюю фракцию с температурой кипения от 39 °С до 40 °С.

8 Проведение испытания

8.1 Экстракция охратоксина А из пробы

В делительную воронку помещают пипеткой 5 см^3 пробы, добавляют 5 см^3 раствора хлористого натрия по 7.2.3, приливают 5 см^3 смеси хлористого метилена и уксусной кислоты по 7.2.2 и встряхивают в течение 1 мин. После расслоения фаз нижний органический слой фильтруют через предварительно смоченный подкисленным хлористым метиленом фильтр «красная лента» в колбу для упаривания.

Примечание – При образовании стойкой эмульсии рекомендуется центрифугировать смесь в течение 2 мин при частоте вращения 5000 об/мин.

Повторяют экстракцию охратоксина А из верхнего слоя еще раз 5 см^3 смеси уксусной кислоты и хлористого метилена по 7.2.2. Полученный экстракт фильтруют в ту же колбу для упаривания.

Фильтр промывают подкисленным хлористым метиленом объемом от 5 до 10 см^3. Экстракт упаривают до сухого остатка в вакууме, поместив колбу в водяную баню при температуре от 40 °С до 45 °С. Сухой остаток растворяют в 0,5 см^3 подвижной фазы, получая таким образом концентрат пробы.

Примечание – На стадии освоения метода, при смене партии экстрагента, а также при возникновении сомнений в достоверности получаемых результатов находят коэффициент прохождения охратоксина А в контрольной пробе в соответствии с приложением А и проверяют приемлемость полученного значения.

8.2 Проведение скрининга проб

Концентрат пробы вина, полученный по 8.1, выдерживают не менее 5 мин. и затем проводят его хроматографический анализ по 8.3.

При отсутствии на хроматограмме пика, идентифицируемого как пик охратоксина А, делают вывод об отсутствии охратоксина А в пробе на уровне нижней границы диапазона измерений (0,001 мг/дм^3) и пробу с добавкой охратоксина А не готовят.

Если на хроматограмме пробы обнаруживают пик, идентифицируемый программным обеспечением к хроматографу как пик охратоксина А (см. 8.3), то в анализируемую пробу вносят

добавку в виде раствора охратоксина А в подвижной фазе (см. 7.3.2). Рекомендуемый объем добавки раствора охратоксина А ($V_{д.р}$, см^3) вычисляют по формуле

$$V_{д.р} = \frac{q \cdot C_X \cdot V_к}{C_{ст}}, \quad (6)$$

где q – коэффициент, значение которого выбирают в диапазоне от 0,5 до 2,0;

C_X – массовая концентрация охратоксина А в концентрате пробы (см.8.3), нг/см^3;

$V_к$ – объем концентрата пробы, см^3 (0,5 см^3);

$C_{ст}$ – массовая концентрация охратоксина А в растворе, используемом для внесения добавки, нг/см^3.

Объем вносимой добавки не должен превышать 5 % объема пробы ($V_{пр}$, см^3). Если это требование не согласуется со значениями, рассчитанными по формуле (6), то для внесения добавки охратоксина А используют раствор с другим значением массовой концентрации.

Пробу с добавкой анализируют согласно 8.1.

8.3 Проведение хроматографических измерений

Регистрируют не менее двух хроматограмм концентрата испытуемой пробы (см. 8.1) и пробы с добавкой (см. 8.2), в тех же условиях, при которых была проведена градуировка хроматографа. Идентификацию охратоксина А проводят по совпадению времени удерживания охратоксина А в экстракте пробы с его временем удерживания, полученным при контроле стабильности градуировочной характеристики, установив ширину окна идентификации 5 %.

Пример хроматограммы приведен на рисунке Б.1 (приложение Б).

Примечание – При необходимости подтверждения правильности идентификации пика охратоксина А рекомендуется выполнить добавку раствора охратоксина А в подвижной фазе к концентрату пробы. О достоверности идентификации можно судить по увеличению высоты предполагаемого пика охратоксина А. Количество добавляемого раствора охратоксина А определяют, исходя из того, что массовая концентрация охратоксина А в пробе должна увеличиться на (50 – 150) % по сравнению с исходным значением.

При наличии на хроматограмме концентрата пробы пика, идентифицированного как пик охратоксина А, вычисляют значение массовой концентрации охратоксина А в концентрате пробы для каждой зарегистрированной хроматограммы с использованием градуировочной характеристики, установленной по 7.5, и проверяют приемлемость полученных значений, используя условие (4). Если условие (4) выполняется, то в качестве результата измерений массовой концентрации охратоксина А в концентрате испытуемой пробы принимают среднеарифметическое значение полученных концентраций (C_X, нг/см^3). Если условие (4) не выполняется, то находят и устраняют причины нестабильности, после чего ввод концентрата пробы повторяют.

При анализе концентрата пробы с добавкой охратоксина А (см. 8.2) также регистрируют две хроматограммы, идентифицируют пик охратоксина А и рассчитывают значение массовой концентрации охратоксина в концентрате по каждой хроматограмме, проверяют приемлемость полученных значений и рассчитывают массовую концентрацию охратоксина А в концентрате пробы с добавкой ($C_{X+д}$, нг/дм^3) как среднеарифметическое значение полученных значений.

Если массовая концентрация охратоксина А в концентрате пробы превышает 100 нг/см^3, то пробу вина разбавляют водой по 6.11 и разбавленную пробу анализируют заново по 8.1. Коэффициент разбавления Q вычисляют по формуле

$$Q = \frac{V_р}{V_а}, \quad (7)$$

где $V_р$ – объем разбавленной пробы, см^3;

$V_а$ – объем аликвоты испытуемой пробы, взятый для разбавления, см^3.

9 Обработка результатов испытания

Массовую концентрацию охратоксина А в пробе вина (X, мг/дм^3) вычисляют по формуле

$$X = \frac{C_{ст} \cdot V_д}{V_{пр}} \cdot \frac{C_X}{C_{X+д} - C_X} \cdot Q \cdot 10^{-3}, \quad (8)$$

где $C_{ст}$ – массовая концентрация раствора охратоксина А, использованного в качестве добавки (см. 8.2), нг/см^3;

$V_д$ – объем добавки раствора охратоксина А к пробе (см. 8.2), см^3;

$V_{пр}$ – объем пробы, взятой для испытаний по 8.1, см^3 (5 см^3);

C_X – массовая концентрация охратоксина А в концентрате пробы (см. 8.3), нг/см^3;

$C_{X+д}$ – массовая концентрация охратоксина А в концентрате пробы с добавкой (см. 8.3), нг/см^3;

Q – коэффициент разбавления пробы вина (см. 8.3). Если разбавление пробы не производили, то $Q = 1$;

10^{-3} – коэффициент согласования размерности единиц массы и объема.

10 Метрологические характеристики

Метод обеспечивает получение результатов измерений с метрологическими характеристиками, не превышающими значений, приведенных в таблице 2.

Таблица 2

Диапазон измерений, мг/дм^3	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в условиях повторяемости при $P = 0,95$) $r_{отн}$, %	Критическая разность (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в условиях воспроизводимости при $P = 0,95$) $CD_{0,95}$, мг/дм^3	Показатель точности (границы* относительной погрешности при доверительной вероятности $P = 0,95$), $\pm \delta$, %
От 0,001 до 0,005 включ.	28	42	30
Св. 0,005 » 0,1 »	18	31	22
* Установленные числовые значения границ относительной погрешности соответствуют числовым значениям относительной расширенной неопределенности $U_{отн}$ при коэффициенте охвата $k = 2$.			

Расхождение между двумя результатами измерений (X_1 и X_2, мг/дм^3), полученными в одной лаборатории в условиях повторяемости, должно соответствовать условию

$$100 \cdot \frac{|X_1 - X_2|}{\bar{X}} \le r_{отн}, \quad (9)$$

где $\bar{X}$ – среднее арифметическое X_1 и X_2, мг/дм^3;

$r_{отн}$ – предел повторяемости (таблица 2), %.

При выполнении условия (9) за результат измерений принимают среднеарифметическое полученных результатов измерений (X_1 и X_2, мг/дм^3).

Расхождение между двумя результатами измерений, полученными в двух лабораториях ($X_{1лаб}$ и $\bar{X}_{2лаб}$, мг/дм^3) на идентичных пробах, должно соответствовать условию

$$100 \cdot \frac{|\bar{X}_{1лаб} - \bar{X}_{2лаб}|}{\bar{X}_{лаб}} \le CD_{0,95}, \quad (10)$$

где $\bar{X}_{лаб}$ – среднее арифметическое $X_{1лаб}$ и $X_{2лаб}$, мг/дм^3;

$CD_{0,95}$ – критическая разность (таблица 2), %.

11 Контроль качества результатов измерений

Контроль показателей качества результатов измерений в лаборатории предусматривает проведение контроля стабильности результатов измерений с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-6 (раздел 6).

12 Оформление результатов испытания

Результаты испытаний регистрируют в протоколе испытаний, который оформляют в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025, при этом протокол испытаний должен содержать ссылку на настоящий стандарт.

Результаты измерений содержания охратоксина А (при подтвержденном в лаборатории соответствии аналитической процедуры требованиям настоящего стандарта) представляют в виде

$$\bar{X} \pm \Delta \text{ либо } \bar{X} \pm U, \quad (11)$$

где $\bar{X}$ – результат измерений, полученный в соответствии с разделом 10, мг/дм^3;

Δ – границы абсолютной погрешности измерений содержания охратоксина А ($P = 0,95$), мг/дм^3, которые вычисляют по формуле

$$\bar{\Delta} = 0,01 \cdot \delta \cdot \bar{X}; \quad (12)$$

U – расширенная неопределенность при коэффициенте охвата $k = 2$, мг/дм^3, которую вычисляют по формуле

$$\bar{U} = 0{,}01 \cdot U_{отн} \cdot \overline{X}. \quad (13)$$

Значения δ ($U_{отн}$) приведены в таблице 2.

Числовые значения границ абсолютной погрешности (неопределенности) выражают числом, содержащим не более двух значащих цифр, при этом наименьший разряд числового значения окончательного результата измерений принимают таким же, как и наименьший разряд числового значения границ абсолютной погрешности (неопределенности).

Приложение А
(рекомендуемое)

Определение коэффициента прохождения охратоксина А

Для определения коэффициента прохождения охратоксина А используют контрольную пробу, для приготовления которой в делительную воронку помещают 5 см^3 дистиллированной воды, добавляют 5 см^3 раствора хлористого натрия по 7.2.3 и вносят 0,5 см^3 раствора охратоксина А массовой концентрации 50 нг/см^3 в подвижной фазе (см. 7.3.2).

Проводят экстракцию охратоксина А по 8.1, приготавливают концентрат контрольной пробы по 8.2 и проводят его хроматографический анализ по 8.3 и, используя градуировочную характеристику по 7.5, вычисляют массовую концентрацию охратоксина А в концентрате контрольной пробы.

Затем вычисляют коэффициент прохождения охратоксина А (η) по формуле

$$\eta = \frac{V_1 \cdot C_X}{C_к \cdot V_к}, \quad (А.1)$$

где V_1 – объем концентрата контрольной пробы, см^3 (0,5 см^3);

C_X – измеренное значение массовой концентрации охратоксина А в концентрате контрольной пробы, нг/см^3;

$C_к$ – значение массовой концентрации охратоксина А в растворе по 7.3.2, нг/см^3;

$V_к$ – объем раствора охратоксина А по 7.3.2, отобранный для приготовления контрольной пробы, см^3 (0,5 см^3).

Коэффициент прохождения охратоксина А определяют не менее трех раз в условиях повторяемости. Полученные значения должны соответствовать следующим требованиям:

- каждое из полученных значений не менее 0,8;
- относительное значение размаха полученных значений соответствует условию

$$\frac{|\eta_{макс} - \eta_{мин}|}{\overline{\eta}} \le 0{,}10, \quad (А.2)$$

где $\eta_{макс}$ и $\eta_{мин}$ – наибольшее и наименьшее из полученных значений коэффициента прохождения охратоксина А;

$\overline{\eta}$ – среднеарифметическое полученных значений коэффициента прохождения охратоксина А.

Если оба этих условия выполняются, то проведение операций по 8.1 считают удовлетворительным. В противном случае находят причины потерь охратоксина А и повторяют определение коэффициента прохождения.

Приложение Б
(справочное)

Пример хроматограммы

На рисунке Б.1 приведен пример хроматограммы концентрата пробы вина красного полусладкого (массовая концентрация охратоксина А в пробе 0,0010 мг/дм^3).

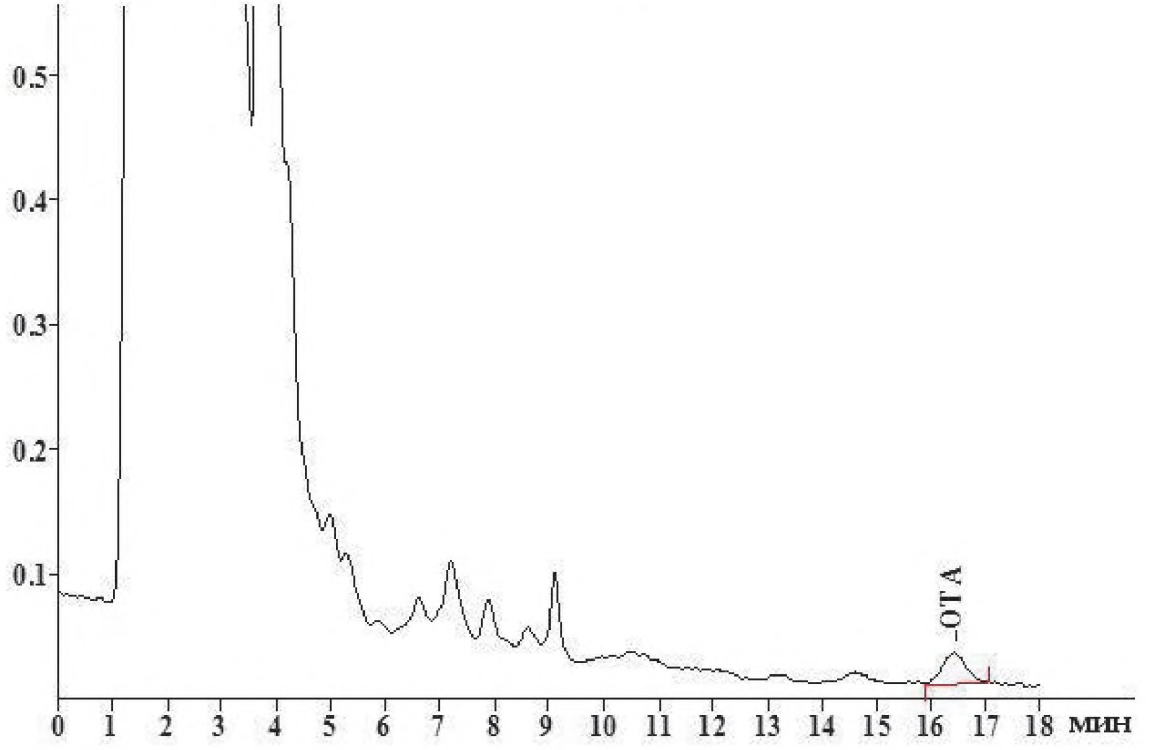

Рисунок Б.1 – Пример хроматограммы

Пик охратоксина А (на рисунке обозначен как ОТА) соответствует значению массовой концентрации охратоксина А в концентрате 7,7 нг/см^3.

УДК 543.544.5.068.7:663.2:006.354 МКС 67.160.10

Ключевые слова: вино, виноматериалы, методы испытаний, высокоэффективная жидкостная хроматография, охратоксин А, экстракция охратоксина А, определение массовой концентрации охратоксина А, концентрирование экстракта, скрининг проб, флуориметрическое детектирование

Редактор *К.В. Дудко*

Корректор *П.М. Смирнов*

Компьютерная верстка *Е.К. Кузиной*

Подписано в печать 08.02.2016. Формат 60x84 1/8.
Усл. печ. л. 1,86. Тираж 45 экз. Зак. 3872.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru