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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ EN 14176— 2015

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение домоевой кислоты в мидиях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

(EN 14176:2003, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и 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 аутентичного перевода на русский язык европейского регионального стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

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
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 июля 2015 г. № 1012-ст межгосударственный стандарт ГОСТ EN 14176—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен европейскому региональному стандарту EN 14176:2003 Foodstuffs — Determination of domoic acid in mussels by HPLC (Продукты пищевые. Определение домоевой кислоты в мидиях методом ВЭЖХ).

Европейский региональный стандарт разработан техническим комитетом CEN/TC 275 «Анализ пищевых продуктов. Горизонтальные методы», секретариатом которого является DIN (Германия).

Перевод с английского языка (en).

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 1
5 Приборы и оборудование 2
6 Отбор проб 2
7 Процедура проведения испытания 3
8 Обработка результатов 4
9 Прецизионность 4
10 Протокол испытаний 5
Приложение А (справочное) Данные по прецизионности методики 6
Библиография 7
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным европейским региональным стандартам 7

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

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение домоевой кислоты в мидиях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Foodstuffs. Determination of domoic acid in mussels by HPLC

Дата введения — 2017—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения домоевой кислоты в мидиях с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Метод успешно прошел валидацию в соответствии с руководством Ассоциации официальных химиков-аналитиков (АОАС) путем межлабораторных испытаний проб мидий с содержанием домоевой кислоты 14,1 мкг/г (проба с внесением домоевой кислоты) и 186 мкг/г (проба, контаминированная домоевой кислотой естественным образом).

Экспериментально установлена применимость метода также в отношении сердцевидки съедобной (*Cerastoderma edule*), скробикулярии плоской (*Scrobicularia plana*), моллюсков *Venerupis pullastra* и *Ruditapes decussate*, устриц (*Crassostrea japonica*) и моллюсков родов *Ensis* и *Solen* [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

Метод основан на экстракции домоевой кислоты из гомогенизированной пробы путем кипячения с соляной кислотой, охлаждении, разбавлении, центрифугировании и фильтрации экстракта и его анализе методом обращенно-фазовой ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием в ультрафиолетовой области спектра.

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.

4.2 Кислота соляная, раствор молярной концентрации $c(HCl) = 0,1$ моль/дм^3.

4.3 Кислота фосфорная, раствор массовой долей $w(H_3PO_4) = 8,5$ %.

4.4 Ацетонитрил для ВЭЖХ.

Издание официальное

4.5 Подвижная фаза

Смешивают две объемных части раствора фосфорной кислоты по 4.3 с 873 объемными частями воды. Проверяют значение pH полученного раствора, которое должно быть равно 2,5. Добавляют 125 объемных частей ацетонитрила по 4.4, смесь перемешивают. Полученную подвижную фазу перед использованием дегазируют. Проводят предварительный хроматографический анализ градуировочного раствора домоевой кислоты по 4.6 и при необходимости корректируют объемную долю ацетонитрила в подвижной фазе так, чтобы время удерживания пика домоевой кислоты составляло примерно 8 мин при прочих неизменных условиях хроматографического анализа.

4.6 Градуировочный раствор домоевой кислоты

Готовят градуировочный раствор домоевой кислоты точно известной массовой концентрации, близкой к 1 мкг/см^3. При необходимости раствор разбавляют водой. Раствор хранят в холодном месте, перед использованием его выдерживают до достижения комнатной температуры.

5 Приборы и оборудование

5.1 Общие положения

При проведении испытания используют обычные лабораторные приборы и оборудование, в частности, перечисленные ниже.

5.2 Блендер или бытовой измельчитель.

5.3 Фильтры мембранные диаметром пор примерно 0,45 мкм в комплекте со стеклянным или одноразовым пластиковым шприцем вместимостью 5 см^3.

5.4 Центрифуга, обеспечивающая фактор разделения 700 g при использовании центрифужных пробирок вместимостью от 50 до 100 см^3, снабженная таймером.

5.5 Пробирки центрифужные вместимостью от 50 до 100 см^3.

5.6 Система для ВЭЖХ

5.6.1 Насос для ВЭЖХ, обеспечивающий постоянную скорость подачи подвижной фазы 1,5 см^3/мин, в комплекте с устройством ввода проб, обеспечивающим объем инжекции 20 мм^3.

5.6.2 Колонка для ВЭЖХ аналитическая, заполненная обращенно-фазовым сорбентом на основе силикагеля с привитыми октадецильными группами, обеспечивающая отделение пика домоевой кислоты от всех прочих пиков на уровне базовой линии.

Колонка, гарантированно обеспечивающая удовлетворительное качество хроматографического разделения, имеет следующие характеристики:

- материал корпуса колонки — нержавеющая сталь или другой подходящий материал;
- длина — 150 мм;
- внутренний диаметр — 4,6 мм;
- диаметр частиц сорбента — 5 мкм.

Примечание — Тип обращенно-фазового сорбента несущественно влияет на результаты анализа при условии, что объемная доля ацетонитрила в подвижной фазе обеспечивает оптимальное время удерживания пика домоевой кислоты (примерно 8 мин) и отделение от прочих пиков компонентов матрицы пробы в начале хроматограммы.

5.6.3 Детектор спектрофотометрический с проточной кюветой, установленный на рабочую длину волны 242 нм.

5.6.4 Система обработки данных.

6 Отбор проб

Важно, чтобы поступающая в лабораторию проба была представительной и не была повреждена или изменила свой состав и свойства при транспортировании или хранении.

7 Процедура проведения испытания

7.1 Общие положения

Всю процедуру испытания необходимо провести за один рабочий день. В течение этого дня при перерывах в проведении испытания пробы и экстракты охлаждают до температуры 4 °С — 7 °С.

Предупреждение — Домоевая кислота в экстракте из пробы нестабильна. Поэтому следует строго соблюдать требования настоящего стандарта относительно температуры и кислотности экстракта на отдельных этапах, а также продолжительности проведения отдельных операций.

Примечание — В кислой среде при комнатной температуре домоевая кислота подвергается медленному разрушению. При хранении экстрактов при комнатной температуре в течение четырех или пяти дней концентрация домоевой кислоты в них уменьшается на 30 % — 50 %. При хранении экстрактов охлажденными до 4 °С заметного изменения концентрации домоевой кислоты в них не наблюдается в течение трех недель [2].

7.2 Подготовка пробы

Мидии снаружи тщательно промывают водой. Пальцами одной руки аккуратно раздвигают створки раковины так, чтобы между ними образовалась узкая щель, в которую вводят лезвие небольшого ножа до тех пор, пока острие не упрется во внутреннюю стенку одной из створок. Сохраняя острие ножа в этом положении, движением лезвия отрезают приводящую мышцу. Поднимают одну створку, после чего внутреннюю часть мидии промывают водой для удаления песка или других примесей. Ножом вырезают мякоть мидии из другой створки.

Перед вскрытием мидий не допускается их нагревать или использовать анестезию. Также не допускается разрезать или повреждать мякоть мидий на этом этапе. Мякоть мидий массой от 100 до 150 г выдерживают на сите в течение 5 мин. Удаляют частицы скорлупы и отбрасывают вытекшую жидкость, после чего мякоть измельчают с помощью блендера или измельчителя по 5.2 до достижения гомогенного состояния.

7.3 Экстракция и очистка экстракта

В стакан вместимостью 250 $см^3$ помещают гомогенизированную мякоть мидий массой примерно 50 г, взвешенной с точностью до 0,1 г. В стакан добавляют 50 $см^3$ раствора соляной кислоты по 4.2, содержимое стакана тщательно перемешивают и быстро (в течение 10 мин) нагревают до кипения. Содержимое стакана выдерживают в кипящем состоянии точно 5 мин при постоянном перемешивании, после чего стакан с содержимым немедленно помещают в ледяную баню и охлаждают до комнатной температуры в течение примерно 10 мин.

Далее смесь переносят в градуированный цилиндр с пробкой вместимостью 100 $см^3$ или мерную колбу и доводят объем содержимого в них до 100 $см^3$ раствором соляной кислоты по 4.2, после чего содержимое колбы или цилиндра перемешивают до достижения однородного состояния смеси.

Порцию полученной смеси объемом не менее 50 $см^3$ переносят в центрифужную пробирку по 5.5 и центрифугируют в течение 5 мин при факторе разделения 700 g. Пипеткой переносят 5 $см^3$ прозрачной надосадочной жидкости в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, объем содержимого в колбе доводят до метки водой, содержимое тщательно перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр по 5.3. Фильтрат объемом от 1 до 2 $см^3$ собирают в подходящий флакон и используют для хроматографического анализа. Если концентрация домоевой кислоты слишком высока для количественного определения, полученный раствор разбавляют до достижения концентрации, приемлемой для количественного определения.

Примечания

1 Увеличение продолжительности кипячения приводит к уменьшению полноты обнаружения домоевой кислоты. При кипячении в течение 10 мин полнота обнаружения домоевой кислоты на 7 % меньше, чем при кипячении в течение 5 мин [2].

2 Охлаждение экстракта при комнатной температуре и его хранение при комнатной температуре приводит к уменьшению полноты обнаружения домоевой кислоты. Полнота обнаружения существенно выше при использовании быстрого охлаждения в холодильнике, морозильной камере или ледяной бане и при хранении растворов проб в охлажденном виде до проведения анализа [2].

7.4 Количественное определение

Проводят хроматографический анализ градуировочного раствора домоевой кислоты по 4.6 при объеме инжекции 20 мм^3 несколько раз до тех пор, пока расхождение между результатами измерений площади или высоты пика домоевой кислоты для трех последовательных инжекций не будет превышать 3 %. При анализе серии растворов проб чередуют анализ раствора пробы и градуировочного раствора.

7.5 Идентификация аналита

Пик домоевой кислоты на хроматограмме раствора пробы можно идентифицировать путем хроматографического анализа раствора пробы с добавкой градуировочного раствора.

8 Обработка результатов

Содержание домоевой кислоты в пробе w, мкг/г, рассчитывают по формуле

$$w = \frac{P_t\, m_{st}}{P_s\, m_s}, \qquad (1)$$

где P_t — высота или площадь пика домоевой кислоты на хроматограмме раствора пробы, в единицах площади или высоты;

m_{st} — масса домоевой кислоты в объеме градуировочного раствора, инжектированного в хроматограф при проведении градуировки, нг;

P_s — высота или площадь пика домоевой кислоты на хроматограмме градуировочного раствора, в единицах площади или высоты;

m_s — масса пробы, инжектированная в хроматограф при анализе раствора пробы, мг.

9 Прецизионность

9.1 Общие положения

Подробности межлабораторных испытаний по определению прецизионности методики приведены в приложении А. Значения метрологических характеристик, полученные в результате межлабораторных испытаний, могут быть неприменимы к другим содержаниям аналита и другим типам матриц, чем те, что указаны в приложении А.

9.2 Повторяемость

Абсолютное расхождение между результатами двух независимых единичных испытаний, полученными одним методом на идентичном объекте испытаний в одной лаборатории одним оператором с использованием одного оборудования в течение короткого промежутка времени, не должно превышать предел повторяемости r более чем в 5 % случаев.

Пределы повторяемости равны следующим значениям:

$\bar{x}$ = 10,1 мкг/г, r = —;

$\bar{x}$ = 13,3 мкг/г, r = —;

$\bar{x}$ = 75,3 мкг/г, r = 10 мкг/г;

$\bar{x}$ = 186 мкг/г, r = 9,8 мкг/г.

9.3 Воспроизводимость

Абсолютное расхождение между результатами двух единичных испытаний, полученными одним методом на идентичном объекте испытаний в разных лабораториях разными операторами с использованием разного оборудования, не должно превышать предел воспроизводимости R более чем в 5 % случаев.

Пределы воспроизводимости равны следующим значениям:

$\bar{x}$ = 10,1 мкг/г, R = 5,5 мкг/г;

$\bar{x}$ = 13,3 мкг/г, R = 5,1 мкг/г;

$\bar{x}$ = 75,3 мкг/г, R = 16 мкг/г;

$\bar{x}$ = 186 мкг/г, R = 67 мкг/г.

10 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать:

- всю информацию, необходимую для идентификации пробы (вид пробы, ее происхождение и маркировку);
- использованный метод испытания со ссылкой на настоящий стандарт;
- дату и способ 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, проведенных в соответствии с [3] и под управлением АОАС с использованием модифицированной процедуры экстракции паралитических токсинов моллюсков по [5].

Таблица А.1 — Данные по прецизионности методики

Проба*	1	2	3	4
Год проведения испытаний	1988	1988	1988	1988
Количество лабораторий-участников	10	10	10	10
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	10	10	10	10
Количество выбросов (лабораторий)	0	0	0	0
Число принятых результатов**	10	9	10	10
Среднее значение $\bar{X}$, мкг/г	10,1	13,3	75,3	186
Стандартное отклонение повторяемости S_r, мкг/г	—	—	3,58	3,49
Относительное стандартное отклонение повторяемости RSD_r, %	—	—	4,8	1,9
Предел повторяемости r (r = 2,8 S_r), мкг/г	—	—	10	9,8
Стандартное отклонение воспроизводимости S_R, мкг/кг	1,96	1,83	5,67	23,85
Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R, %	19,4	13,7	7,5	12,8
Предел воспроизводимости R (R = 2,8 S_R), мкг/г	5,5	5,1	16	67
Полнота обнаружения, %	72	71	—	—

* 1 — проба с внесением домоевой кислоты;
2 — проба с внесением домоевой кислоты;
3 — проба, контаминированная домоевой кислотой естественным образом;
4 — проба, контаминированная домоевой кислотой естественным образом.

** Каждый результат представляет собой среднеарифметическое значение результатов двух инжекций.

Библиография

[1] Vale, P., and M. Sampayo, M.A., «Evaluation of extraction methods for analysis of domoic acid in naturally contaminated shellfish from Portugal», Harnful Algae 1, Issue 2, June 2002, p.p. 127—135

[2] Lawrence et al. «Liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish products using the paralytic shellfish poison extraction procedure of the association of official analytical chemists», J. Chromatogr., 1989, 462, p.p. 349—356

[3] «Guidelines for collaborative study to validate characteristics of a method of analysis» J. AOAC Int., 1989, 72, p.p. 694 — 704

[4] Lawrence et al. «Liquid chromatographic determination of domoic acid in mussels using AOAC paralytic shellfish poison extraction procedure: collaborative study», J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1991, Vol. 74, No 1, p.p. 68—72

[5] Official methods of Analysis (1984), 14th Ed., AOAC, Arlington, VA, 18.086—18.092; 15th Ed., 1990, 959.08

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.

УДК 664:543.544.5.068.7:006.354 МКС 67.120.30 IDT

Ключевые слова: пищевые продукты, мидии, домоевая кислота, определение, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, экстракция, очистка экстракта, спектрофотометрическое детектирование в ультрафиолетовой области спектра

Редактор *К.В. Дудко*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Подписано в печать 08.02.2016. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Тираж 42 экз. Зак. 3924.

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