МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
32835—
2014**

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение микотоксинов методом тандемной высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС)

Издание официальное

**Москва
Стандартинформ
2015**

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 Федеральным государственным образовательным учреждением высшего профессионального образования «Московский государственный университет пищевых производств» (ФГБОУ ВПО «МГУПП»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 июня 2014 г. № 45-2014)

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
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 19 августа 2014 г. № 896-ст ГОСТ 32835–2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2016 г.

5 Настоящий стандарт разработан с учетом положений следующих международных документов:

- CODEX STAN 247—2005 Codex General Standard For Fruit Juices And Nectars of the Codex Alimentarius Commission (Единый международный стандарт Комиссии Кодекс Алиментариус на фруктовые соки и нектары);
- Regulation of the Commission of the European Union of 23.02.2006 г. No. 406/2006/EC Laying down the sampling methods and methods of analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs (Регламент Комиссии Европейского союза от 23.02.2006 г. № 406/2006/ЕС «О методах отбора проб и методах анализа для официального контроля уровней микотоксинов в пищевых продуктах»);
- AIJN Code of Practice for Evaluation of Quality and Authenticity of Fruit and Vegetable Juices of the European Fruit Juice Association (Свод правил для оценки качества и подлинности фруктовых и овощных соков Европейской ассоциации фруктовых соков).

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, 2015

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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКЦИЯ СОКОВАЯ

Определение микотоксинов методом тандемной высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС)

Juice products. Determination of mycotoxins by tandem high performance liquid mass spectrometry (HPLC-MS/MS)

Дата введения — 2016—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на соки и другую соковую продукцию из фруктов и овощей, за исключением клеток цитрусовых фруктов, и устанавливает метод определения микотоксинов – патулина и охратоксина А – с применением тандемной высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии в диапазоне измерений массовой концентрации патулина от 0,1 до 100,0 мкг/дм^3 и охратоксина А от 0,1 до 20,0 мкг/дм^3.

Примечание – Настоящий стандарт рекомендуется применять в целях апробации и накопления дополнительной информации в части его применения.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные 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 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

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

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

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

ГОСТ ИСО 5725-1–2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ГОСТ ИСО 5725-2–2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений

ГОСТ 5789–78 Реактивы. Толуол. Технические условия

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

ГОСТ 20015–88 Хлороформ. Технические условия

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

ГОСТ 26313–84 Продукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб

ГОСТ 26671–85 Продукты переработки плодов и овощей, консервы мясные и мясорастительные. Подготовка проб для лабораторных анализов

ГОСТ 29030–91 Продукты переработки плодов и овощей. Пикнометрический метод определения относительной плотности и содержания растворимых сухих веществ

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

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

ГОСТ 32689.1–2014 Продукция пищевая растительного происхождения. Мультиметоды для газохроматографического определения остатков пестицидов Часть 1. Общие положения

ГОСТ 32689.2–2014 Продукция пищевая растительного происхождения. Мультиметоды для газохроматографического определения остатков пестицидов Часть 2. Методы экстракции и очистки

ГОСТ 32689.3–2014 Продукция пищевая растительного происхождения. Мультиметоды для газохроматографического определения остатков пестицидов Часть 3. Определение и подтверждение результатов

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Сокращения

ВЭЖХ-МС/МС – тандемная высокоэффективная жидкостная хроматомасс-спектрометрия;

ОТА – охратоксин А;

ПАТ – патулин;

ESI – ионизация распылением в электрическом поле (*Electrospray Ionization*);

IARC – Международное агентство по исследованию онкологических заболеваний;

LOD – предел детектирования;

LOQ – предел количественного определения;

SRM – идентификация компонентов в режиме контроля селективных реакций (*Selected Reaction Monitoring*).

4 Сущность метода

Сущность метода заключается в предварительной экстракции микотоксинов ПАТ и ОТА ацетонитрилом в присутствии безводного сульфата магния, концентрировании, перерастворении в ацетонитриле и количественном определении массовой концентрации микотоксинов с применением ВЭЖХ-МС/МС с ионизацией распылением в электрическом поле и идентификацией компонентов в режиме контроля селективных реакций.

5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, стандартные образцы, реактивы и посуда

Система аналитическая ВЭЖХ-МС/МС* с трехквадрупольным масс-детектором для измерения в диапазоне масс от 10 до 3000 атомных единиц массы (а. е. м.), с точностью измерения массы не ниже 0,1 а. е. м, ионизацией распылением в электрическом поле, возможностями работы в режиме контроля выбранных реакций и сканирования дочерних и родительских ионов, минимальным отношением сигнал/шум ≥ 1000:1. Аналитическая система должна включать модуль ВЭЖХ, состоящий из бинарного насоса со смесителем, термостат хроматографической колонки, обеспечивающий температуру нагрева до 50 °С, и хроматографическую колонку с обращенно-фазовым сорбентом зернением 5 мкм C_{18} длиной 150 мм и внутренним диаметром 3 мм. Применяемая система должна обеспечивать обнаружение микотоксинов в интервале от 0,1 до 100,0 мкг/дм^3.

Спектрофотометр диапазоном измерения, позволяющим проводить испытания при длине волны от 250 до 400 нм, допускаемой абсолютной погрешностью измерений оптической плотности не более 0,1 %.

* Дополнительная информация о рекомендуемых ВЭЖХ-МС/МС системах приведена в приложении А.

Весы по ГОСТ OIML R 76-1, обеспечивающие точность взвешивания с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания не более ± 0,01 мг.

Баня ультразвуковая.

Центрифуга со скоростью вращения ротора 4000 – 5000 об/мин для пробирок вместимостью 50 $см^3$.

Центрифуга со скоростью вращения ротора 10000 – 12000 об/мин для пробирок типа Эппендорф вместимостью 1,5 – 2,0 $см^3$.

Шкаф сушильный, обеспечивающий поддержание температуры до 200 °С.

Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

Встряхиватель для перемешивания.

Устройства дозирующие жидких проб постоянной или переменной вместимостью 20 – 1000 $мм^3$ с относительной погрешностью дозирования фактического объема не более 2,5 %.

Микрофильтр – насадка на шприц (регенирированная целлюлоза, диаметр 13 мм, размер пор 0,2 – 0,4 мкм).

Кюветы кварцевые рабочей длиной 1 см.

Микотоксины ПАТ и ОТА для использования в качестве образцов сравнения с содержанием основного вещества не менее 98 %.

Кислота ледяная уксусная по ГОСТ 61, ч. д. а.

Ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ.

Метанол для градиентной ВЭЖХ.

Магний сернокислый безводный, х. ч.

Кальций хлористый безводный, гранулированный, х. ч.

Хлороформ по ГОСТ 20015, х. ч.

Толуол по ГОСТ 5789, х. ч.

Спирт этиловый абсолютированный.

Вода для лабораторного анализа степени чистоты 1 по ГОСТ ISO 3696.

Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1, 2, 5, 10 $см^3$ 2-го класса точности по ГОСТ 29227.

Колбы мерные 2-го класса точности вместимостью 5, 10, 25, 50, 100 и 1000 $см^3$ исполнений 2 или 2а по ГОСТ 1770.

Колбы остродонные вместимостью 10, 25 $см^3$.

Центрифужная пробирка типа Эппендорф вместимостью 1,5 – 2,0 $см^3$.

Микропробирка вместимостью 100 – 400 $мм^3$.

Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 250 $см^3$ любого исполнения по ГОСТ 1770.

Пробирка для центрифугирования с завинчивающейся крышкой вместимостью 50 $см^3$

Чашка фарфоровая диаметром 125 – 150 мм.

Эксикатор лабораторный вместимостью 3 $дм^3$.

Воронки лабораторные по ГОСТ 25336.

Колбы плоскодонные вместимостью 50, 100, 250 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Стаканы химические вместимостью 10, 20, 50, 100 и 200 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, посуды, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающим необходимую точность измерения, а также стандартных образцов, реактивов и материалов по качеству не хуже вышеуказанных.

6 Отбор проб

Отбор проб – по ГОСТ 26313. Подготовка и хранение проб – по ГОСТ 26671, ГОСТ 32689.1, ГОСТ 32689.2 и ГОСТ 32689.3.

7 Подготовка к проведению испытаний

7.1 Общие требования

Перед испытанием проводят предварительную подготовку лабораторной посуды, а также проверку качества реактивов и вспомогательных материалов согласно требованиям ГОСТ 32689.1, ГОСТ 32689.2 и ГОСТ 32689.3.

7.2 Приготовление вспомогательных растворов

7.2.1 Приготовление подвижной фазы А

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 с плотно закрывающейся пришлифованной стеклянной или фторопластовой пробкой помещают пипеткой 1 см^3 ледяной уксусной кислоты, 100 см^3 метанола и доводят до метки бидистиллированной водой. Смесь тщательно перемешивают.

Срок хранения подвижной фазы А при комнатной температуре – не более одного месяца.

7.2.2 Приготовление подвижной фазы Б

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 с плотно закрывающейся пришлифованной стеклянной или фторопластовой пробкой помещают пипеткой 1 см^3 ледяной уксусной кислоты и доводят до метки метанолом. Смесь тщательно перемешивают.

Срок хранения подвижной фазы Б при комнатной температуре – не более одного месяца.

Примечание – Недопустим контакт подвижной фазы с резиной и полимерными материалами [за исключением политетрафторэтилена (ПТФЭ)].

7.2.3 Приготовление растворителя 1

В подходящей емкости смешивают 99 объемных частей толуола и одну объемную часть ледяной уксусной кислоты. Смесь тщательно перемешивают.

Срок хранения растворителя 1 при комнатной температуре – не более 6 мес.

7.3 Подготовка сернокислого магния

Используемый при проведении экстракции в качестве сорбента сернокислый безводный магний даже в пределах срока годности необходимо высушивать для удаления поглощенной влаги воздуха. Сорбент прокаливают при температуре 180 °С – 200 °С в течение 6 – 10 ч и хранят в эксикаторе над безводным хлористым кальцием. Критерием годности реактива служит отсутствие дополнительного водного слоя при нагревании раствора, проведении стадии экстракции до температуры 30 °С – 40 °С и через 2 – 3 мин перемешивания реакционной массы.

7.4 Приготовление исходных растворов микотоксинов

7.4.1 Приготовление растворов ПАТ

7.4.1.1 Приготовление исходного раствора ПАТ массовой концентрации 200 мкг/см^3

Берут 2,0 мг чистого кристаллического ПАТ, взвешенного с точностью 0,01 мг, растворяют в мерной колбе вместимостью 10 см^3 в небольшом количестве хлороформа и затем доводят объем раствора хлороформом до метки.

Срок хранения исходного раствор ПАТ при температуре 0° С в стеклянной мерной колбе с притертой пробкой, плотно завернутой в алюминиевую фольгу, – не более 1 мес.

7.4.1.2 Приготовление раствора ПАТ массовой концентрации 20 мкг/см^3

Переносят 1 см^3 полученного исходного раствора ПАТ (см. 7.4.1.1) в мерную колбу вместимостью 10 см^3 и доводят объем раствора хлороформом до метки. Для определения точной массовой концентрации ПАТ в растворе отбирают 5,0 см^3 полученного стандартного раствора ПАТ и переносят в емкость вместимостью около 15 см^3, затем продуванием азотом удаляют хлороформ до получения сухого вещества. Сразу после получения сухого вещества вносят в емкость 5,0 см^3 абсолютного этанола. Полностью растворяют ПАТ. Полученный раствор ПАТ вносят в кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 см, затем регистрируют на спектрофотометре спектр раствора в интервале длин волн от 250 до 350 нм, используя в кювете сравнения в качестве контроля абсолютный этанол.

Массовую концентрацию ПАТ в растворе $C_{ПАТ}$, мкг/см^3, рассчитывают по формуле

$$C_{ПАТ} = \frac{A \cdot MW \cdot 1000 \cdot CF}{\varepsilon}, \quad (1)$$

где A – максимальное значение оптической плотности спектра (длина волны около 275 нм), ед. ОП;

MW – молекулярная масса ПАТ, равная 153,1 г/моль;

1000 – коэффициент пересчета;

CF – поправочный коэффициент, определенный согласно приложению А;

ε –молярный коэффициент оптического поглощения (экстинкции), равный 14600, м^2/моль.

7.4.1.3 Приготовление раствора ПАТ массовой концентрации 100 мкг/см^3

5 $см^3$ исходного раствора ПАТ в хлороформе массовой концентрации 200 мкг/$см^3$ (см. 7.4.1.1) переносят в мерную колбу вместимостью 10 $см^3$, концентрируют до сухого остатка при комнатной температуре под током азота и немедленно перерастворяют в ацетонитриле, доводя им объем в колбе до метки.

7.4.1.4 Срок хранения растворов ПАТ по 7.4.1.2 и 7.4.1.3 при температуре 0 °С в стеклянной мерной колбе с притертой пробкой, плотно завернутой в алюминиевую фольгу, – не более 24 ч.

Перед использованием температуру растворов доводят до комнатной (не допускается удалять алюминиевую фольгу с мерной колбы до достижения содержимым комнатной температуры). По причине деструкции ПАТ не допускается хранить образцы сравнения в виде тонкой пленки сухого вещества, полученной после удаления растворителя [1] – [2].

7.4.2 Приготовление исходного раствора ОТА

7.4.2.1 Приготовление исходного раствора ОТА массовой концентрации 20 мкг/$см^3$

2,0 мг чистого кристаллического ОТА, взвешенного с точностью 0,01 мг, растворяют в химическом стакане вместимостью 25 $см^3$ растворителем 1 (см. 7.2.3) и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доводят растворителем 1 объем раствора до метки.

Для определения точной массовой концентрации ОТА в растворе полученный исходный раствор ОТА вносят в кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 см, затем регистрируют на спектрофотометре спектр раствора в интервале длин волн от 300 до 370 нм, используя в кювете сравнения в качестве контроля растворитель 1.

Массовую концентрацию ОТА в исходном растворе $C_{ОТА}$, мкг/$см^3$, рассчитывают по формуле

$$C_{ОТА} = \frac{A \cdot MW \cdot 1000 \cdot CF}{\varepsilon}, \quad (2)$$

где A – максимальное значение оптической плотности спектра (длина волны около 333 нм), ед. ОП;

MW –молекулярная масса ОТА, равная 402,7 г/моль;

1000 – коэффициент пересчета;

CF – поправочный коэффициент, определенный согласно приложению А;

ε –молярный коэффициент оптического поглощения (экстинкции), равный 544, $м^2$/моль.

Срок хранения исходного раствора ОТА при температуре минус 18 °С в стеклянной мерной колбе с притертой пробкой, плотно завернутой в алюминиевую фольгу, – не более четырех лет.

7.4.2.2 Приготовление раствора ОТА массовой концентрации 5 мкг/$см^3$

Отбирают 2,5 $см^3$ исходного раствора ОТА (7.4.2.1), переносят в мерную колбу вместимостью 10 $см^3$ и доводят растворителем 1 (см. 7.2.3) до метки.

Срок хранения раствора ОТА при температуре 4 °С в стеклянной мерной колбе с притертой пробкой, плотно завернутой в алюминиевую фольгу, – не более 24 ч.

Перед использованием температуру раствора доводят до комнатной (не допускается удалять алюминиевую фольгу с мерной колбы до достижения содержимым комнатной температуры) [1] – [4].

7.5 Приготовление градуировочных растворов ПАТ и ОТА

Градуировочные растворы ПАТ и ОТА готовят путем смешивания определенных объемов их исходных растворов (см. 7.4.1.1 и 7.4.2.1) с осветленным яблочным соком, который не содержит определяемые аналиты.

7.5.1 Приготовление градуировочных растворов ПАТ

7.5.1.1 Приготовление промежуточного раствора ПАТ массовой концентрации 1000 нг/$см^3$ (раствор *п*-1)

1 $см^3$ раствора ПАТ (см. 7.4.1.3) или 1 $см^3$ стандартного образца состава ПАТ массовой концентрации ПАТ 100 мкг/$см^3$ переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доводят ацетонитрилом объем раствора до метки.

7.5.1.2 Приготовление промежуточного раствора ПАТ массовой концентрации 10 нг/$см^3$ (раствор *п*-2)

1 $см^3$ раствора *п*-1 (см. 7.5.1.1) переносят в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ и доводят ацетонитрилом объем раствора до метки.

7.5.1.3 Приготовление градуировочных растворов ПАТ

Отбирают в соответствии с таблицей 1 определенные объемы промежуточных растворов *п*-1 и *п*-2 (см. 7.5.1.1 и 7.5.1.2) и вносят в мерные колбы вместимостью 10 $см^3$.

Т а б л и ц а 1 – Объемы растворов *п*-1 и *п*-2 для приготовления градуировочных растворов ПАТ

Наименование показателя	Градуировочные растворы						
	1	2	3	4	5	6	7
Объем раствора *п*-2, $см^3$	0,1	0,5	1,0	–	–	–	–
Объем раствора *п*-1, $см^3$	–	–	–	0,1	0,2	0,5	1,0
Количество введенного ПАТ, нг	1	5	10	100	200	500	1000
Массовая концентрация ПАТ в растворе, $нг/см^3$	0,1	0,5	1,0	10	20	50	100

Доводят объем раствора в колбах до метки осветленным яблочным (или иным фильтрованным) соком.

Срок хранения градуировочного раствора при температуре 0 °С – 4 °С в стеклянной мерной колбе с притертой пробкой – не более 24 ч.

7.5.2 Приготовление градуировочных растворов ОТА

7.5.2.1 Приготовление промежуточного раствора ОТА массовой концентрации 200 $нг/см^3$ (раствор *А*-1)

1 $см^3$ раствора ОТА концентрацией 5 $мкг/см^3$ (см. 7.4.2.2) концентрируют до сухого остатка под током азота при комнатной температуре и немедленно переносят с помощью ацетонитрила в мерную колбу вместимостью 25 $см^3$.

7.5.2.2 Приготовление промежуточного раствора ОТА массовой концентрации 10 $нг/см^3$ (раствор *А*-2)

0,5 $см^3$ промежуточного раствора ОТА *А*-1 (см. 7.5.2.1) переносят в мерную колбу вместимостью 10 $см^3$ и доводят ацетонитрилом раствор до метки.

7.5.2.3 Приготовление градуировочных растворов ОТА

Отбирают в соответствии с таблицей 2 определенные объемы промежуточных растворов *А*-1 и *А*-2 (см. 7.5.2.1 и 7.5.2.2) и вносят в мерные колбы вместимостью 10 $см^3$.

Т а б л и ц а 2 – Объемы растворов *А-1* и *А-2* для приготовления градуировочных растворов ОТА

Наименование показателя	Градуировочные растворы						
	1	2	3	4	5	6	7
Объем раствора *А*-2, $см^3$	0,1	0,2	0,5	1,0	–	–	–
Объем раствора *А*-1, $см^3$	–	–	–	–	0,25	0,5	1,0
Количество введенного ОТА, нг	1	2	5	10	50	100	200
Массовая концентрация ОТА в растворе, $нг/см^3$	0,1	0,2	0,5	1,0	5,0	10	20

Доводят объем раствора в колбах до метки осветленным яблочным (или иным фильтрованным) соком.

Для проведения испытания в ВЭЖХ-МС/МС систему инжектируют по 10 $мм^3$ приготовленных по 7.5.1.3 и 7.5.2.3 градуировочных растворов ПАТ и ОТА и проводят градуировку согласно 7.7 с учетом условий по 8.3.1.

Срок хранения градуировочного раствора при температуре 0 °С – 4 °С в стеклянной мерной колбе с притертой пробкой – не более 24 ч.

7.6 Подготовка ВЭЖХ-МС/МС системы

Подготовку ВЭЖХ-МС/МС системы к измерениям проводят в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации и информацией, приведенной в приложении Б.

При настройке режимов работы масс-спектрометра рекомендуется использовать МС/МС параметры для определения микотоксинов, приведенные в приложении Б.

При этом должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха от 20 °С до 25 °С;
- атмосферное давление от 84 до 106 кПа;
- напряжение в электросети (220 ± 10) В;
- частота тока в электросети от 49 до 51 Гц;
- относительная влажность воздуха от 40 % до 80 %.

7.7 Градуировка ВЭЖХ-МС/МС системы

Градуировку системы растворами микотоксинов в соках по 7.5 проводят в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации к ВЭЖХ-МС/МС системе и с учетом условий по 8.3.1 один

раз в месяц. На хроматограммах определяют площади пиков ПАТ и ОТА и по площади пика устанавливают градуировочную зависимость в интервале концентраций согласно 7.5. Рассчитывают коэффициент корреляции и отклонения рассчитанных значений массовой концентрации микотоксинов в каждой градуировочной точке от фактического значения в соответствии с процедурой приготовления градуировочных растворов (см. 7.5). Градуировку считают приемлемой, если коэффициент корреляции составляет не менее 0,999 (для ПАТ) и 0,965 (для ОТА), а относительное отклонение рассчитанного значения массовой концентрации от фактического значения не более ± 10 %.

Вместо относительного отклонения приемлемость градуировочной характеристики может быть оценена по относительному стандартному отклонению, которое не должно превышать 5 %.

8 Проведение испытаний

8.1 Экстракция

10 см^3 ($V_{пр}$) предварительно тщательно перемешанной соковой продукции вносят в пробирку для центрифугирования с завинчивающейся крышкой вместимостью 50 см^3. В пробирку добавляют 20 см^3 ацетонитрила и 15 г безводного сернокислого магния. Смесь интенсивно перемешивают в течение трех – пяти минут вручную или с помощью встряхивателя. После перемешивания полученный экстракт центрифугируют в течение 10 мин при 4000 – 5000 об/мин при комнатной температуре или 5 мин при наличии центрифуги с охлаждением при температуре 5 °С. Измеряют общий объем экстракта после центрифугирования (V). 18 – 19 см^3 ($V_э$) экстракта, отобранного с помощью пипетки или дозирующего устройства, переносят в остродонную колбу вместимостью 25 см^3. Раствор концентрируют до сухого остатка под током азота при комнатной температуре или на роторном испарителе при температуре не более 40 °С и немедленно перерастворяют в 1 см^3 ($V_к$) ацетонитрила.

При наличии на стенках сосуда нерастворимой карамельной пленки проводят ее разрушение в ультразвуковой ванне в течение трех – пяти минут. Раствор переносят в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1,5 – 2,0 см^3 и центрифугируют при 10000 – 12000 об/мин в течение 3 – 5 мин. Отбирают верхний слой и фильтруют через микрофильтр с размерами пор 0,2 – 0,4 мкм непосредственно в микропробирку вместимостью 100 – 400 мм^3. Для проведения испытания в ВЭЖХ-МС/МС систему инжектируют 10 мм^3 приготовленной пробы.

8.2 Приготовление пробы из концентрированных продуктов

Концентрированные соки (пюре) восстанавливают водой до минимального уровня растворимых сухих веществ, предусмотренного нормативными документами на конкретный вид соковой продукции. Концентрированную соковую продукцию, минимальные уровни растворимых сухих веществ для которой не предусмотрены, восстанавливают бидистиллированной водой до содержания растворимых сухих веществ 11,2 %. Содержание растворимых сухих веществ контролируют по ГОСТ 29030.

Экстракцию восстановленных проб проводят по 8.1.

8.3 Проведение измерений

8.3.1 Общие условия

Инжекцию подготовленных по 8.1 проб и градуировочных растворов проводят в выбранной последовательности. Наиболее распространен способ, когда инжекция градуировочных растворов начинает и завершает серию инжекций проб.

ВЭЖХ-МС/МС система должна быть настроена на режим *SRM* с переходами, обеспечивающими селективное детектирование анализируемых микотоксинов. Времена удерживания и площади пиков определяют с помощью программного обеспечения для регистрации и расчета результатов анализа, прилагаемого к ВЭЖХ-МС/МС системе. Примеры ВЭЖХ/МС/МС систем, условия разделения и масс-спектрометрического детектирования приведены в приложении Б.

Испытания проб проводят в условиях повторяемости для двух параллельных определений в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-1 (подраздел 3.14) и ГОСТ ИСО 5725-2.

8.3.2 Идентификация микотоксинов

Для идентификации микотоксинов времена удерживания, полученные на растворах проб, сравнивают со временем удерживания соответствующих микотоксинов из градуировочных растворов. Для подтверждения присутствия микотоксинов проводят сравнение соотношения интенсивностей сигналов из первого и второго *m/z*-перехода с соотношением интенсивностей сигналов микотоксинов из градуировочных растворов.

Соотношение пиков для одного микотоксина не должно отличаться более чем на 20 % от ожидаемого соотношения интенсивностей сигналов.

9 Обработка и оформление результатов испытаний

9.1 Количественное определение

Количественное определение микотоксинов в инжектированном объеме приготовленного экстракта (см. 8.1) проводят путем сравнения площади (или высоты) пика микотоксина с соответствующей градуировочной характеристикой для данного микотоксина.

Массовую концентрацию микотоксинов в испытуемой продукции C, мкг/дм^3, рассчитывают по формуле

$$C = \frac{1000 \cdot M \cdot V_к \cdot V}{V_{инж} \cdot V_{пр} \cdot V_э}, \quad (3)$$

где 1000 – коэффициент перевода из кубических сантиметров в кубические дециметры;

M – концентрация микотоксина в объеме экстракта 10 мм^3, инжектированном в ВЭЖХ-МС/МС систему, определенное по градуировочной зависимости, нг;

$V_к$ – объем ацетонитрила, в котором был перерастворен экстракт после концентрирования, см^3;

V – общий объем экстракта, из которого отбирается для концентрирования объем $V_э$, см^3;

$V_{инж}$ – объем пробы, введенный в хроматограф ($V_э$= 10 мм^3), мм^3;

$V_{пр}$ – объем пробы соковой продукции, взятой для испытания, см^3;

$V_э$ – объем экстракта, отобранный для концентрирования, см^3.

При расчете количества микотоксинов в концентрированной соковой продукции учитывают степень ее разбавления водой согласно 8.2.

За результат измерений принимают среднеарифметическое результатов трех параллельных определений, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{3 \cdot \left| w_{Пмакс} - w_{Пмин} \right| \cdot 100}{\left(w_{П1} + w_{П2} + w_{П3} \right)} \le CR_{0,95}, \quad (4)$$

где $w_{Пмакс}$, $w_{Пмин}$ – максимальное и минимальное значения из полученных трех результатов параллельных определений, мкг/дм^3;

$w_{П1}$, $w_{П2}$, $w_{П3}$ – результаты трех параллельных определений, мкг/дм^3;

$CR_{0,95}$ – значение критического диапазона, % .

Расхождение между тремя параллельными определениями (в процентах от среднего значения), выполненными в одной лаборатории, не должно превышать предела повторяемости (сходимости) $CR_{0,95}$, равного 3,6· S_r при вероятности P = 0,95. При соблюдении этого условия за окончательный результат измерения принимают среднеарифметическое значение трех параллельных определений, округленное до третьего десятичного знака.

Результаты измерений регистрируют в протоколе в соответствии с ГОСТ ИСО/МЭК 17025.

9.2 В случае, если полученный результат показывает, что содержание микотоксина превышает верхнюю границу диапазона градуировочной зависимости, подготавливают новую пробу, увеличивая ее разбавление водой, и проводят повторное измерение.

10 Метрологические характеристики

Метрологические характеристики метода для ПАТ и ОТА соответствуют условиям, приведенным в таблице 3.

Т а б л и ц а 3 – Показатели прецизионности метода ВЭЖХ-МС/МС

Диапазон измерений, мкг/дм^3	Относительное стандартное отклонение повторяемости S_r, %	Относительное стандартное отклонение воспроизводимости S_R, %
при определении ПАТ (не более)		
< 20	30	40
20-50	20	30
> 50	15	25

Окончание таблицы 3

Диапазон измерений, мкг/дм^3	Относительное стандартное отклонение повторяемости S_r, %	Относительное стандартное отклонение воспроизводимости S_R, %
при определении ОТА (не более)		
< 1	40	60
1 – 10	20	30
> 10	15	20

Пределы обнаружения ПАТ и ОТА в пробах соковой продукции составляют: *LOD* – 0,03 мкг/дм^3, *LOQ* – 0,1 мкг/дм^3.

11 Контроль качества результатов измерений

Контроль показателей качества результатов измерений в лаборатории предусматривает проведение контроля стабильности результатов измерений с использованием проверки стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения промежуточной прецизионности. Проверку стабильности осуществляют с применением контрольных карт Шухарта. Периодичность контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируют во внутрилабораторных документах системы качества. При неудовлетворительных результатах контроля, например, при превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

12 Требования безопасности

При проведении измерений следует соблюдать требования:

- электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019 и технической документации на ВЭЖХ-МС/МС систему;
- 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.

ВНИМАНИЕ! При работе с микотоксинами следует учитывать, что ПАТ и ОТА обладают сильными токсическими свойствами с выраженным нефротоксическим, иммунотоксическим, тератогенным и генотоксическим действием. Согласно классификации *IARC* ОТА относится к потенциально опасным для человека канцерогенным веществам (группа 2В). При работе с микотоксинами необходимо соблюдать повышенные меры безопасности. Персонал лаборатории должен носить защитную одежду, в том числе защитную маску, перчатки и очки. Все операции с микотоксинами проводят в вытяжном шкафу. После завершения работ использованную лабораторную посуду и отходы подвергают деактивации.

Приложение А
(обязательное)

Поверка спектрофотометра и определение поправочного коэффициента *CF* для расчета массовых концентраций микотоксинов в стандартных растворах

А.1 Для определения массовых концентраций микотоксинов в исходных растворах (см. 7.4.1.1 и 7.4.2.1) используют спектрофотометр, пригодный для измерения оптической плотности растворов в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см в интервале длин волн от 200 до 400 нм.

Калибровку спектрофотометра проводят следующим образом.

Измеряют оптическую плотность *A* трех растворов дихромата калия ($K_2Cr_2O_7$) в серной кислоте (H_2SO_4) – 0,25; 0,125 и 0,0625 ммоль/дм^3 в максимальной точке поглощения (длина волны около 350 нм), используя в качестве контроля раствор серной кислоты (H_2SO_4) концентрации 0,009 ммоль/дм^3.

Затем рассчитывают значение молярного коэффициента оптической плотности ε, м^2/моль, для каждой концентрации дихромата калия по формуле

$$\varepsilon = \frac{A \cdot 1000}{C}, \qquad (A.1)$$

где *A* – измеренное значение оптической плотности раствора дихромата калия в серной кислоте для соответствующей концентрации, ед. ОП;

C – концентрация раствора дихромата калия в серной кислоте, ммоль/дм^3.

Если разница между тремя полученными значениями ε выходит за пределы гарантированного интервала точности измерений оптической плотности *A*, то необходимо проверить процедуру выполнения калибровки или оборудование. Рассчитывают среднеарифметическое значение ε.

Определяют поправочный коэффициент *CF* (безразмерная величина) для конкретного оборудования (спектрофотометра и кювет) по формуле

$$CF = \frac{3160}{\varepsilon}, \qquad (A.2)$$

где 3160 – характерное значение молярного коэффициента оптической плотности для растворов дихромата калия ($K_2Cr_2O_7$), м^2/моль;

ε – молярный коэффициент оптической плотности, рассчитанный по формуле (А.1), м^2/моль.

Если полученное значение поправочного коэффициента *CF* менее 0,95 или более 1,05, то для устранения отклонений необходимо проверить процедуру выполнения калибровки или оборудование (для калибровки и проверки чистоты используют один и тот же набор кювет) [1] – [3].

Приложение Б
(справочное)

Примеры ВЭЖХ-МС/МС систем для определения микотоксинов в соках и другой соковой продукции*

Б.1 ВЭЖХ-МС/МС система № 1

Аппаратная платформа: Varian 320-MS LC/MS/MS.

Ионный источник: ионизация в электроспрее (*ESI*).

Система подачи растворителей: Varian Prostar 210.

Автоматический податчик проб: Varian Prostar 430.

Хроматографическая колонка: Polaris C-18A с размером зерна сорбента 5 мкм, длиной 150 мм, внутренним диаметром 3,0 мм.

Подвижная фаза А: см. 7.2.1.

Подвижная фаза Б: см. 7.2.2.

Температура хроматографической колонки: комнатная.

Объем инжекции пробы: 10 мм^3.

Скорость подвижной фазы и градиент приведены в таблице Б.1.

Таблица Б.1 – Скорость подвижной фазы и градиент

Время, мин	Скорость подвижной фазы, см^3/мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза Б, %
00,00	0,285	100	0
25,00	0,285	15	85
25,01	0,400	100	0
35,00	0,400	100	0

Параметры настройки ионного источника и общие параметры масс-спектрометра приведены в таблице Б.2.

Таблица Б.2 – Параметры настройки ионного источника и общие параметры масс-спектрометра

Параметры	Значение
Режим ионизации	*ESI* (позитивный или негативный)
Коллизионный газ	Аргон (1,8 мТорр)
Распылительный газ (*G*1), кПа	346
Вспомогательный газ (*G*2), кПа	207
Напряжение ионного распыления, В	4500
Температура *G*2, °С	250
Капилляр	Режим сканирования (см. таблицу А.3)
Защита (shield), В	600
Детектор, В	1900
Ширина *SIM* (селективное детектирование избранных ионов), а. е. м.	0,7

Примеры МС/МС параметров для определения микотоксинов приведены в таблице Б.3.

Таблица Б.3 – Примеры МС/МС параметров для определения микотоксинов

Микотоксины	Ионизация	Квазимолекулярный ион	Масса Q1 (amu)	Капилляр *V*	Первый *SRM*		Второй *SRM*		Время задержки (dwell time), с
					Масса *Q*3 (amu)	Энергия коллизии *V*	Масса *Q*3 (amu)	Энергия коллизии *V*	
ПАТ	*ESI*-	[M-H]-	153,1	40	108,9	7,00	81,00	10,0	0,3
ОТА	*ESI*-	[M-H]-	402,7	70	358,0	18,5	167,0	34,0	0,3

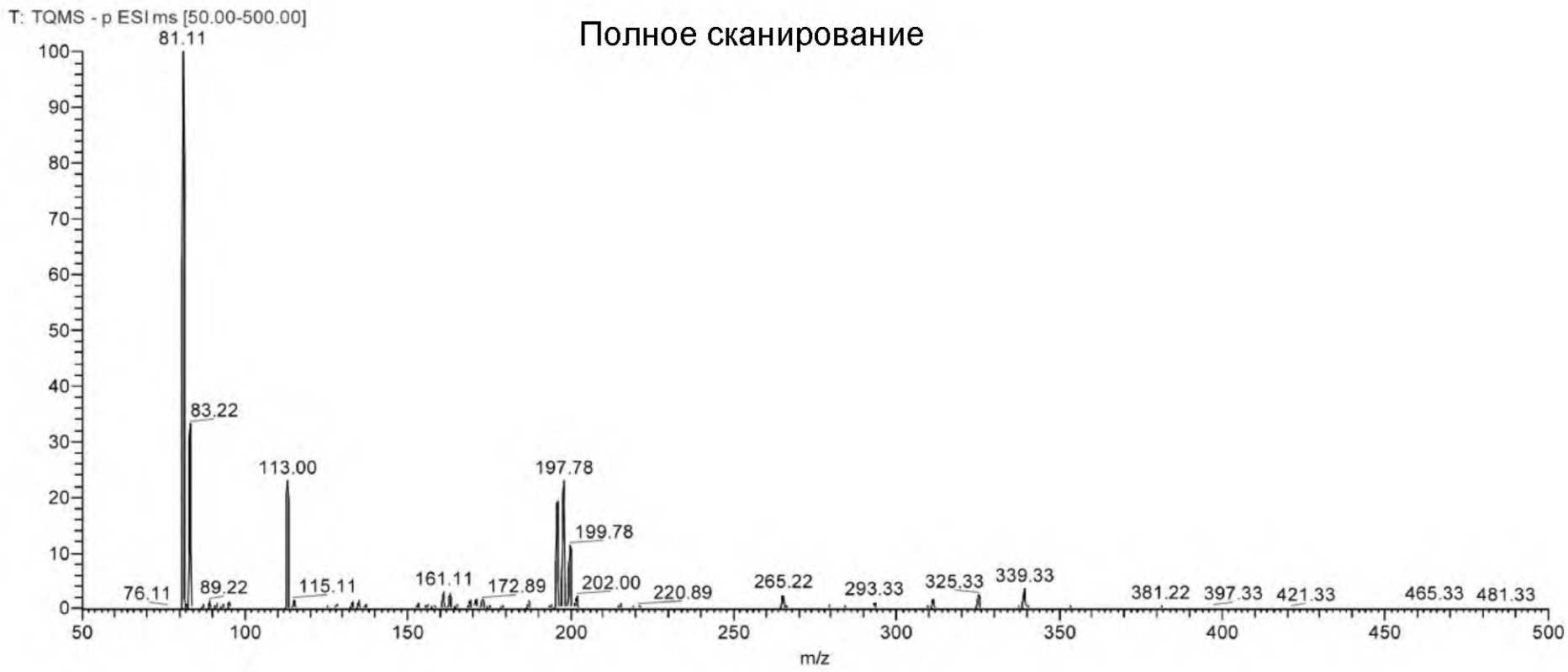
Б.2 Допускается использование других аналитических систем ВЭЖХ-МС/МС и способов подготовки проб, находящихся в продаже, например, Agilent 1260 Infinity Binary LC or 1290 Infinity LC system, Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC-MS system, Agilent SampliQ QuEChERS AOAC Extraction kit, p/n 5982-5755, Agilent SampliQ QuEChERS AOAC Dispersive SPE kits for Highly Pigmented Fruits and Vegetables, p/n 5982-5321 (2 ml) and p/n 5982-5356 (15 ml)**. Системы для подготовки проб и проведения аналитического измерения должны обеспечивать соблюдение условий определения, установленные настоящим стандартом [5] – [7].

Масс-спектры, полученные на ВЭЖХ-МС/МС системе согласно вышеприведенным примерам определения микотоксинов, приведены на рисунках Б.1 и Б.2.

* Данные примеры являются рекомендуемыми и приведены для удобства пользователей настоящего стандарта.

** Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

Полное сканирование



Режим MC/MC (*m/z* 153)

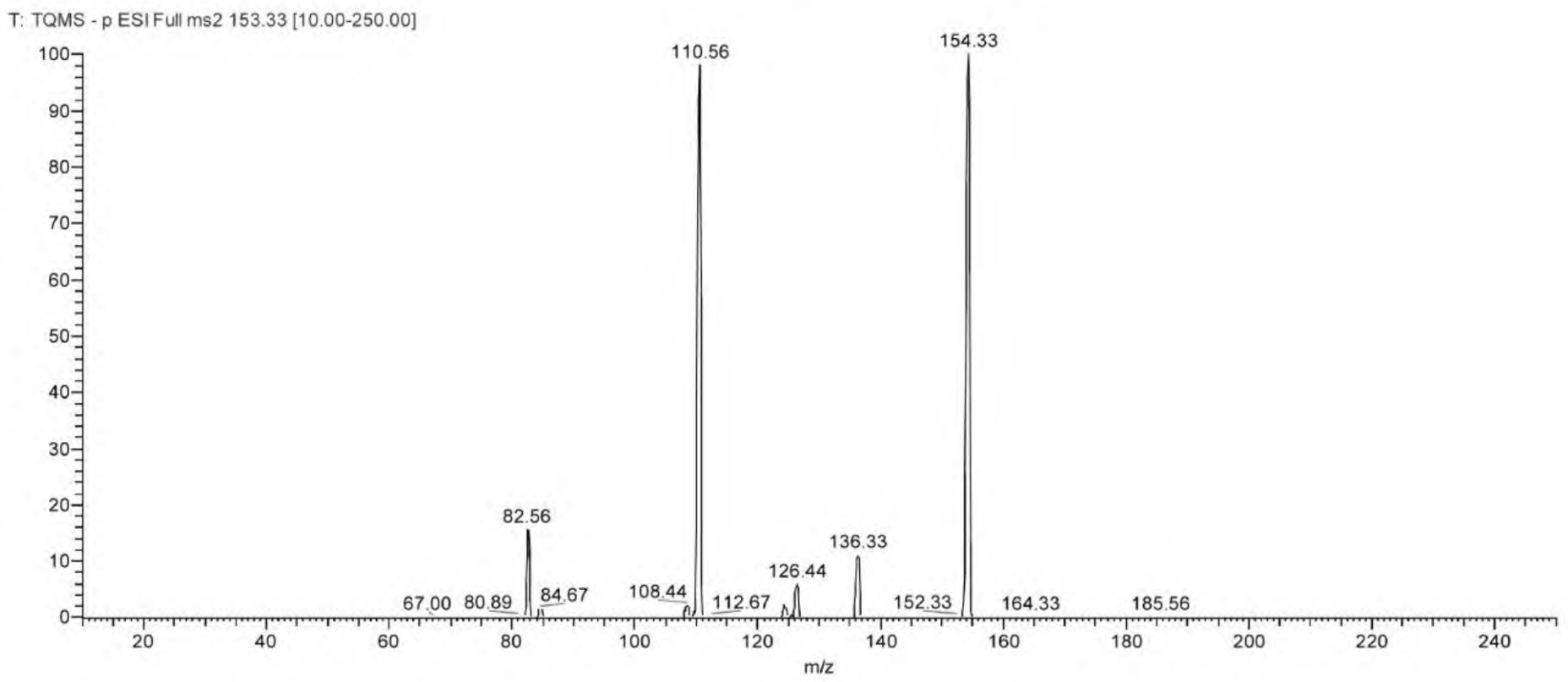
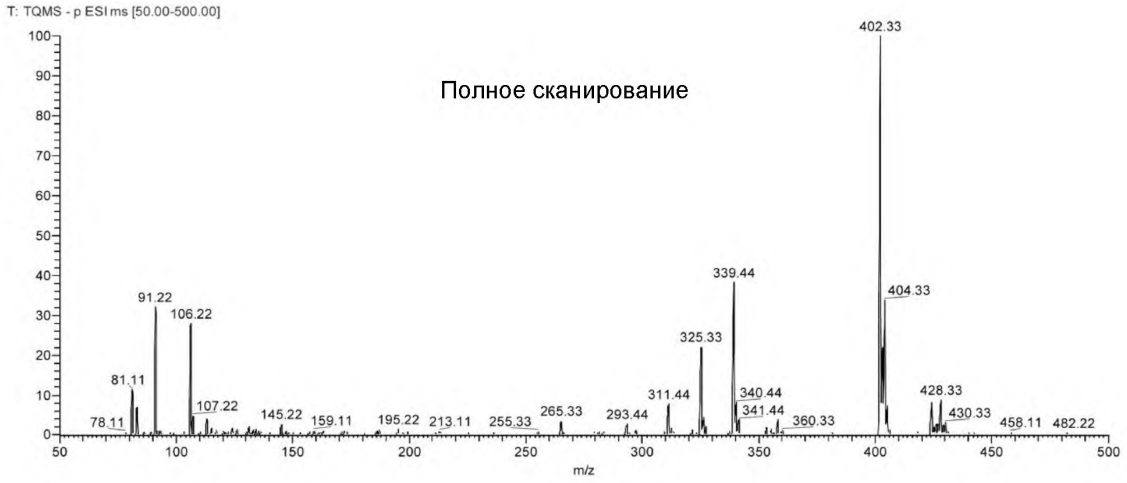


Рисунок Б.1 – ПАТ



Режим MC/MC (m/z 402)

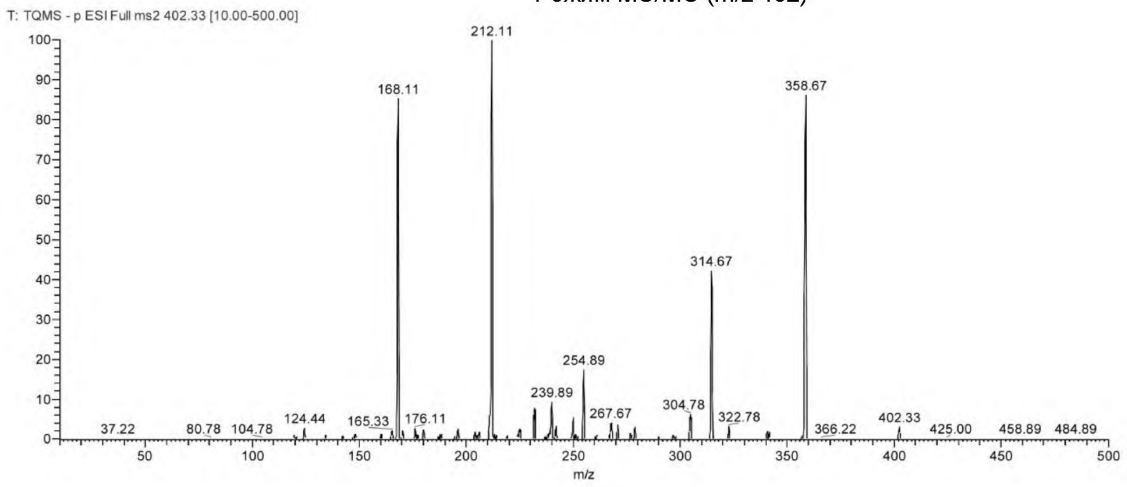


Рисунок Б.2 – ОТА

Библиография

[1] Международный официальный метод AOAC 995.10 (метод AOAC-IUPAC-IFU) «Патулин в яблочном соке»

[2] Международный официальный метод AOAC 2000.02 «Патулин в прозрачных и мутных яблочных соках»

[3] Международный официальный метод AOAC 970.44 «Приготовление стандартных веществ для афлатоксинов»

[4] Международный официальный метод AOAC 2001.01 «Определение охратоксина А в вине и пиве»

[5] В.Сьюрам, Дж. Дж. Найр, Т.В.Ньювулдт, Н.Л.Леггот, Г.С.Шефард «Определение патулина в яблочном соке методом высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии с химической ионизацией при атмосферном давлении». Периодическое специализированное издание Journal of Chromatography A, 2000.- 897.- p. 365-374

[6] Т. Рундбергет, А.Л. Вилкинс «Определение микотоксинов плесеней рода в пищевых продуктах и кормах методом высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии». Периодическое специализированное издание Journal of Chromatography A, 2002.- 964.- p. 189 – 197

[7] М. Рурабхатла «Мультикомпонентный анализ микотоксинов с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС». Методические указания, Varian, 00394, 2006.- 6 p.

УДК 664.8:006.354 МКС 67.080.01 NEQ

Ключевые слова: соковая продукция, методы испытаний, высокоэффективная жидкостная хроматография, тандемная масс-спектрометрия, микотоксины, патулин, охратоксин А

Подписано в печать 16.03.2015. Формат 60x84 1/8.

Усл. печ. л. 1,86. Тираж 31 экз. Зак. 549

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