МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

**ГОСТ 32587– 2013**

# ЗЕРНО И ПРОДУКТЫ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ, КОМБИКОРМА

## Определение охратоксина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

(ISO 15141-1:1998, NEQ)

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 (ТК 335)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 14 ноября 2013 г. № 44-2013)

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 |
|---|---|---|
| Беларусь | BY | Госстандарт Республики Беларусь |
| Киргизия | KG | Кыргызстандарт |
| Россия | RU | Росстандарт |
| Таджикистан | TJ | Таджикстандарт |

4 Настоящий стандарт соответствует основным положениям международного стандарта ISO 15141-1:1998 Foodstuffs – Determination of ochratoxin A in cereals and cereal products – Part 1: High performance liquid chromatographic method with silica gel clean up (Продукты пищевые. Определение содержания охратоксина А в зерне и зерновых продуктах. Часть 1. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с очисткой на силикагеле).

Степень соответствия – неэквивалентная (NEQ)

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 декабря 2013 г. № 2429-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32587–2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2015 г.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Март 2016 г.

*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.

МКС 65.120
67.060

**Поправка к ГОСТ 32587—2013 Зерно и продукты его переработки, комбикорма. Определение охратоксина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

| В каком месте | Напечатано | Должно быть | | |
|---|---|---|---|---|
| Предисловие. Таблица согласования | — | Казахстан | KZ | Госстандарт Республики Казахстан |

(ИУС № 4 2020 г.)

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

# ЗЕРНО И ПРОДУКТЫ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ, КОМБИКОРМА

## Определение охратоксина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Grain and products of its processing, mixed feeds.
Determination of ochratoxin A by high performance liquid chromatography

**Дата введения – 2015–07–01**

## 1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на зерно и продукты его переработки и устанавливает методы определения содержания охратоксина А с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее – ВЭЖХ) с флуориметрическим детектированием с применением:

- скрининга проб и очистки методом колоночной хроматографии (метод А) в продовольственном зерне, мукомольно-крупяных изделиях на основе пшеницы, кукурузы, ячменя, ржи, овса и риса, комбикормов и сырья для их производства на зерновой основе (жмых, шрот) в диапазоне измерений массовой доли охратоксина А от 0,0025 до 1,0 млн$^{-1}$;
- очистки методом твердофазной экстракции (метод Б) в зерне злаков и муке в диапазоне измерений массовой доли охратоксина А более 0,0004 млн$^{-1}$.

Примечание – 1 млн$^{-1}$ соответствует 1 мг/кг или 1000 мкг/кг.

## 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 2603–79 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3118–77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

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

ГОСТ 4166–76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4204–77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4209–77 Реактивы. Магний хлористый 6-водный. Технические условия

ГОСТ 5556–81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

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

ГОСТ 5789–78 Реактивы. Толуол. Технические условия

ГОСТ 5848–73 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 6995–77 Реактивы. Метанол-яд. Технические условия

ГОСТ 9293–74 Азот газообразный и жидкий. Технические условия

ГОСТ 9968–86 Метилен хлористый технический. Технические условия

ГОСТ 13586.3–83 Зерно. Правила приемки и методы отбора проб

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

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

ГОСТ 20015–88 Хлороформ. Технические условия

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

ГОСТ 26312.1–84 Крупа. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ 27668–88 Мука и отруби. Приемка и методы отбора проб

ГОСТ 28311–89 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

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

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 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 испытаниям

Отбор проб по ГОСТ 13586.3, ГОСТ 26312.1, ГОСТ 27668.

Из объединенной пробы выделяют лабораторную пробу массой не менее 100 г, которую размалывают до такого состояния, чтобы она проходила через сито с размером диаметра отверстий 1 мм. Выделенную размолотую лабораторную пробу тщательно перемешивают и хранят до проведения испытаний в сухом темном месте в сосуде под крышкой.

Пробы муки испытывают без размалывания.

## 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 Метод А

### 5.1 Сущность метода

Метод основан на экстракции охратоксина А из анализируемой пробы продукта подкисленным хлороформом, скрининге проб, которые могут содержать охратоксин А, очистке их экстрактов методом колоночной хроматографии на силикагеле и определении массовой доли охратоксина А с применением ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием.

### 5.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, стандартные образцы, реактивы, посуда и материалы

5.2.1 Хроматограф жидкостный с флуориметрическим или спектрофлуориметрическим детектором, обеспечивающим возбуждение флуоресценции в спектральной области (330 ± 20) нм и реги-

страцию интенсивности флуоресценции в спектральной области (465 ± 20) нм. Применяемый детектор должен обеспечивать предел обнаружения охратоксина А не более 5 нг/см$^3$

5.2.2 Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1-2011 с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,01 г.

5.2.3 Колонка хроматографическая аналитическая, заполненная обращенно-фазовым сорбентом зернением 5 мкм, имеющая эффективность не менее 5000 теоретических тарелок по пику охратоксина А*.

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

5.2.5 Колонка хроматографическая стеклянная с пришлифованной пробкой длиной 200 мм и внутренним диаметром 10 мм.

5.2.6 Измельчитель проб, обеспечивающий измельчение до частиц размером менее 1 мм, например лабораторная мельница.

5.2.7 Испаритель ротационный типа ИР-1М2 или аналогичный, снабженный водяной баней с регулятором температуры в диапазоне от 20 °С до 50 °С.

5.2.8 Устройство для перемешивания проб (шейкер), обеспечивающее частоту встряхивания до 120 мин$^{-1}$.

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

5.2.10 Шкаф сушильный, обеспечивающий температуру до 200 °С.

5.2.11 Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

5.2.12 Стандартный образец состава раствора охратоксина А в ацетонитриле массовой концентрации 50 мкг/см$^3$ с допускаемой погрешностью ± 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 5.3.3.1.

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

5.2.14 Натрий сернокислый по ГОСТ 4166, безводный.

5.2.15 Кислота уксусная по ГОСТ 61, ледяная.

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

5.2.17 Гексан для жидкостной хроматографии, ос. ч.

5.2.18 Хлороформ по ГОСТ 20015, очищенный.

5.2.19 Кислота муравьиная по ГОСТ 5848, ч.

5.2.20 Кислота серная по ГОСТ 4204, ч. д. а.

5.2.21 Азот газообразный по ГОСТ 9293.

5.2.22 Пипетки градуированные типов 1 - 3 исполнений 1(1а) или 2(2а) 2-го класса точности вместимостью 1, 2, 5 см$^3$ по ГОСТ 29227.

5.2.23 Цилиндры мерные исполнений 1 - 4 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 250 см$^3$ по ГОСТ 1770.

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

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

5.2.26 Колбы плоскодонные типа П-1 или Кн-1 вместимостью 50, 100, 250 см$^3$ по ГОСТ 25336.

5.2.27 Дозаторы пипеточные одноканальные переменного объема от 100 до 1000 мм$^3$ с метрологическими характеристиками по ГОСТ 28311.

5.2.28 Воронки лабораторные типа В по ГОСТ 25336.

5.2.29 Стаканы В-1-50 или Н-1-50 по ГОСТ 25336.

5.2.30 Пробирка для микропроб однократного применения (типа Эппендорф) вместимостью 1,5 см$^3$.

5.2.31 Стеклянные емкости вместимостью 50, 250, 1000 см$^3$ с пришлифованными стеклянными, фторопластовыми или полиэтиленовыми пробками.

5.2.32 Сито с диаметром отверстий 1,0 мм.

5.2.33 Палочки стеклянные.

5.2.34 Часы песочные или таймер.

5.2.35 Фильтры бумажные «красная лента».

---

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

5.2.36 Вата медицинская по ГОСТ 5556.

5.2.37 Силикагель для колоночной хроматографии с размером частиц от 100 до 200 мкм.

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

**5.3 Подготовка к проведению испытаний**

**5.3.1 Подготовка стеклянной посуды**

Посуду для приготовления и хранения подвижной фазы моют только серной кислотой по 5.2.20 (без применения других моющих средств), тщательно промывают водопроводной водой и ополаскивают дистиллированной водой.

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

**5.3.2 Приготовление вспомогательных растворов**

5.3.2.1 Приготовление подвижной фазы

В мерную колбу вместимостью 500 $см^3$ с плотно закрывающейся пришлифованной стеклянной, фторопластовой или полиэтиленовой пробкой помещают 5 $см^3$ ледяной уксусной кислоты (см. 5.2.15), 215 $см^3$ ацетонитрила (см. 5.2.16) и доводят до метки дистиллированной водой. Смесь тщательно перемешивают. Недопустим контакт подвижной фазы с резиной.

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

5.3.2.2 Приготовление раствора уксусной кислоты объемной долей 1 %

В плоскодонную колбу вместимостью 250 $см^3$ помещают 200 $см^3$ дистиллированной воды и 2 $см^3$ ледяной уксусной кислоты (см. 5.2.15) и тщательно перемешивают.

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

5.3.2.3 Приготовление смеси хлороформа и муравьиной кислоты в объемном соотношении 100 : 2

В плоскодонную колбу вместимостью 250 $см^3$ помещают 200 $см^3$ хлороформа (см. 5.2.18) и 4 $см^3$ муравьиной кислоты (см. 5.2.19). Добавляют 10 г безводного сернокислого натрия (см. 5.2.14). Смесь тщательно перемешивают, фильтруют через фильтр «красная лента».

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

**5.3.3 Приготовление растворов охратоксина А**

5.3.3.1 Приготовление исходного раствора охратоксина А с массовой концентрацией 1 $мкг/см^3$

Пипеткой отбирают 1 $см^3$ стандартного образца состава раствора охратоксина А в ацетонитриле массовой концентрации 50 $мкг/см^3$ (см. 5.2.12), помещают в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$ и доводят объем до метки ацетонитрилом (см. 5.2.16).

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

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 1 мин. Затем полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$ и разбавляют до метки ацетонитрилом.

Примечание – Допускается приготовление исходного раствора охратоксина А по 6.2.14 - 6.2.15 с использованием ацетонитрила вместо подвижной фазы по 6.2.10.

5.3.3.2 Приготовление раствора охратоксина А в ацетонитриле с массовой концентрацией 100 $нг/см^3$

В мерную колбу вместимостью 50 $см^3$ помещают 5 $см^3$ раствора охратоксина А с массовой концентрацией 1 $мкг/см^3$ по 5.3.3.1, что соответствует 1000 $нг/см^3$, и доводят объем до метки подвижной фазой по 5.3.2.1.

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

5.3.3.3 Приготовление градуировочных растворов охратоксина А

Исходный раствор охратоксина А в ацетонитриле по 5.3.3.1 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 5.3.3.1, $см^3$ | Номинальное значение массовой концентрации, $нг/см^3$ |
|---|---|---|
| 1 | 5,0 | 100 |
| 2 | 2,0 | 40 |
| 3 | 1,0 | 20 |
| 4 | 0,5 | 10 |

Содержимое колбы разбавляют до метки подвижной фазой по 5.3.2.1 в соответствии с таблицей 1.

Срок хранения градуировочных растворов – не более семи дней.

Примечание – При необходимости допускается приготовление аналогичным способом растворов охратоксина А других концентраций в диапазоне линейности градуировочной характеристики (см. 5.3.7).

5.3.3.4 Все растворы охратоксина А хранят в холодильнике при температуре не выше 6 °С или в морозильной камере при температуре не выше минус 18 °С в стеклянных или фторопластовых сосудах.

Фактическое значение массовой концентрации охратоксина А в растворах по 5.3.3.1 – 5.3.3.3 вычисляют, исходя из значений массовой концентрации охратоксина А по паспорту стандартного образца.

Перед использованием растворы выдерживают до достижения комнатной температуры.

**5.3.4 Подготовка стеклянной хроматографической колонки**

Стеклянную хроматографическую колонку готовят непосредственно перед проведением испытания.

В стакан вместимостью 50 $см^3$ помещают (1,0 ± 0,1) г силикагеля (см. 5.2.37), добавляют от 10 до 15 $см^3$ хлороформа (см. 5.2.18) и тщательно перемешивают. Полученную суспензию выдерживают в стакане в течение 4 – 5 мин и затем в несколько приемов через воронку диаметром 25 или 36 мм переносят суспензию силикагеля в колонку, предварительно поместив на ее дно кусочек ваты.

После оседания силикагеля в колонке на него сверху насыпают слоем около 2 г безводного сернокислого натрия (см. 5.2.14).

В процессе работы с колонкой нельзя допускать высыхания сорбента, для чего необходимо поддерживать над осушителем слой растворителя. В состоянии готовности колонка должна быть заполнена хлороформом выше уровня сорбента, закрыта стеклянной пришлифованной пробкой, а выход колонки должен быть погружен в хлороформ.

Подготовленную колонку используют однократно.

**5.3.5 Подготовка хроматографа**

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

Устанавливают рабочие длины волн возбуждения и регистрации флуоресценции (см. 5.2.1). Скорость подачи подвижной фазы задают в зависимости от типоразмеров колонки, руководствуясь указаниями изготовителя хроматографа и колонки. Например, для колонки, указанной в 5.2.3, рекомендуемая объемная скорость подвижной фазы составляет 200 $мм^3$/мин. При наличии термостата колонок устанавливают температуру (25 ± 1) °С.

**5.3.6 Условия хроматографического анализа**

Если используют хроматографическую колонку по 5.2.3 и подвижную фазу по 6.2.10, то хроматографический анализ проводят в следующих условиях:

- длина волны возбуждения флуоресценции.....330 нм;
- длина волны регистрации флуоресценции.....465 нм;
- скорость потока подвижной фазы .....200 $мм^3$/мин;
- объем дозирования.....20 $мм^3$;
- температура термостата колонки (при его наличии)...(25 ± 1) °С.

При использовании колонок других типоразмеров скорость потока подвижной фазы и объем дозирования выбирают в соответствии с указаниями изготовителя хроматографа и колонки.

**5.3.7 Градуировка хроматографа**

Диапазон линейности градуировочной характеристики составляет от 10 до 100 $нг/см^3$. В качестве образцов для градуировки хроматографа используют градуировочные растворы охратоксина А по 5.3.3.3.

Регистрируют не менее двух хроматограмм каждого градуировочного раствора и проводят градуировку хроматографа, устанавливая параметры градуировочной характеристики и время удерживания охратоксина А, используя программное обеспечение к хроматографу.

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. 5.3.3.3).

Градуировку считают приемлемой, если:

- коэффициент корреляции не менее 0,998;

- относительное отклонение рассчитанного значения массовой концентрации охратоксина А от фактического значения не более ± 10 %. Вместо относительного отклонения приемлемость градуировочной характеристики может быть оценена по относительному стандартному отклонению, которое не должно превышать 5 %.

**5.3.8 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 5.3.3.3. Массовую концентрацию охратоксина А в контрольном образце 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.

Сходимость значений времени удерживания и значений массовой концентрации охратоксина А проверяют по формулам:

$$\frac{|t_1 - t_2|}{\bar{t}} \le 0{,}05, \qquad (1)$$

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

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

$$\frac{|C_{K1} - C_{K2}|}{\overline{C}_K} \le 0{,}07, \qquad (2)$$

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

$$\frac{|\overline{C}_K - C|}{C} \le 0{,}12, \qquad (3)$$

где $C$ – массовая концентрация охратоксина А в контрольном растворе, нг/см$^3$.

Если условие (3) не выполняется, то процедуру контроля повторяют. Результаты повторного контроля считают окончательными, и градуировку хроматографа по 5.3.7 проводят заново.

Примечание – Повторная градуировка хроматографа, как правило, требуется при изменении эффективности хроматографической системы или чувствительности детектора (например, после проведения ремонта или длительного простоя хроматографа).

**5.3.9 Контроль холостой реактивной пробы**

Испытание холостой реактивной пробы проводят перед испытанием исследуемых проб.

В плоскодонную колбу вместимостью 50 см$^3$ помещают 30 см$^3$ хлороформа и 2,5 см$^3$ раствора уксусной кислоты по 5.3.2.2, тщательно перемешивают и осторожно отбирают из нижнего слоя 20 см$^3$ хлороформа в остродонную колбу для упаривания вместимостью 50 см$^3$, не допуская попадания в нее воды.

Остродонную колбу помещают в ротационный испаритель и упаривают в вакууме до сухого остатка при температуре водяной бани от 40 °С до 45 °С. Продолжают выполнять все операции по 5.4.3, получая таким образом концентрат холостой пробы. Проводят хроматографическое исследование полученного концентрата по 5.4.4. Если на хроматограмме присутствуют пики, по времени удерживания близкие к пику охратоксина А, то находят и устраняют причины загрязнения холостой пробы (реактивы или посуда).

Примечание – Наиболее распространенной причиной неудовлетворительного результата контроля холостой пробы является недостаточная чистота хлороформа, который может быть загрязнен примесями, имеющими близкие к охратоксину А значения времени удерживания. Такой хлороформ необходимо заменить или подвергнуть тщательной перегонке, собирая среднюю фракцию с температурой кипения от 60 °С до 62 °С.

**5.3.10 Учет потерь охратоксина А в процессе подготовки проб**

В плоскодонную колбу вместимостью 50 см$^3$ помещают 30 см$^3$ хлороформа (см. 5.2.18) и 2,5 см$^3$ раствора уксусной кислоты (см. 5.3.2.2), вносят 0,25 см$^3$ раствора охратоксина А в ацетонитриле массовой концентрации 100 нг/см$^3$ (см. 5.3.3.2). Тщательно перемешивают и осторожно отбирают 20 см$^3$ хлороформного (нижнего) слоя в остродонную колбу для упаривания вместимостью 50 см$^3$, не допуская попадания в нее воды. Упаривают до сухого остатка в вакууме при температуре водяной бани от 40 °С до 45 °С.

Далее продолжают выполнять все операции по 5.4.3, проводят хроматографический анализ полученного концентрата по 5.4.4 и, используя градуировочную характеристику по 5.3.7, вычисляют массовую концентрацию охратоксина А в концентрате.

Затем вычисляют коэффициент прохождения охратоксина А η по формуле

$$\eta = \frac{m_X}{m_0}, \qquad (4)$$

где $m_X$ – измеренное значение массы охратоксина А в пробе, нг;

$m_0$ – масса охратоксина А, введенного в качестве добавки, нг.

Измеренное значение массы охратоксина А в пробе $m_X$, нг, вычисляют по формуле

$$m_X = \frac{V_1 \cdot V_2 \cdot C_X}{V_3}, \qquad (5)$$

где $V_1$ – объем хлороформа, взятого для экстракции, см$^3$ (30 см$^3$);

$V_2$ – объем конечного концентрата пробы, см$^3$ (0,5 см$^3$);

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

$V_3$ – объем хлороформного экстракта, отобранного для упаривания, см$^3$ (20 см$^3$).

Массу охратоксина А, введенного в качестве добавки $m_0$, нг, вычисляют по формуле

$$m_0 = C_0 \cdot \mathrm{V}_0, \qquad (6)$$

где $C_0$ – фактическое значение массовой концентрации охратоксина А в растворе по 5.3.3.2, нг/см$^3$;

$V_0$ – объем раствора охратоксина А по 5.3.3.2, отобранный для приготовления контрольного образца, см$^3$ (0,25 см$^3$).

Коэффициент прохождения охратоксина А определяют не менее трех раз на стадии освоения методики и затем при смене партий реактивов. Полученные значения должны соответствовать следующим требованиям:

- каждое из полученных значений не менее 0,7;
- относительное значение размаха полученных значений соответствует условию

$$\frac{|\eta_{\text{макс}} - \eta_{\text{мин}}|}{\overline{\eta}} \le 0{,}10, \qquad (7)$$

где $\eta_{\text{макс}}$ и $\eta_{\text{мин}}$ – 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 среднеарифметическое значение коэффициента прохождения охратоксина А используют при расчете результатов определения по формуле (9). В противном случае находят причины потерь охратоксина А и повторяют определение коэффициента прохождения.

Примечания

1 Причиной неудовлетворительного результата определения коэффициента прохождения может быть повышенная скорость прохождения элюента через колонку.

2 Следует обратить особое внимание на необходимость определения коэффициента прохождения охратоксина А при смене партии силикагеля. Рекомендуется при переходе к новой партии силикагеля провести оптимизацию объемов элюентов, используемых при колоночной очистке проб (см.5.4.3), добиваясь наибольшего значения коэффициента прохождения. Найденные при этом объемы используют при очистке проб на колонках, изготовленных из данной партии реагента.

3 Рекомендуется уточнить для конкретных матриц коэффициент прохождения охратоксина А с использованием стандартных образцов состава продукции с аттестованным значением массовой доли охратоксина А либо путем анализа «чистой» пробы (охратоксин А в пробе не обнаруживается), в которую внесена добавка охратоксина А. Анализируют стандартный образец (пробу с добавкой охратоксина А) согласно 5.4.1 – 5.4.4. Вычисляют результат анализа (см. 5.5) и находят коэффициент прохождения охратоксина А как отношение полученного результата к аттестованному значению массовой доли охратоксина А в стандартном образце или к массовой доле охратоксина А в добавке.

**5.4 Проведение испытаний**

**5.4.1 Экстракция охратоксина А из пробы**

Пробу измельченного продукта массой (5,00 ± 0,01) г помещают в плоскодонную колбу вместимостью 100 $см^3$. Добавляют 30 $см^3$ хлороформа (см. 5.2.18) и 2,5 $см^3$ раствора уксусной кислоты (см. 5.3.2.2), интенсивно перемешивают 30 мин. Пропускают полученный экстракт через бумажный складчатый фильтр «красная лента», отбирая 20 $см^3$ фильтрата для упаривания.

Если не удается отобрать 20 $см^3$ фильтрата, то отбирают максимально возможный объем, измеряют его и используют полученное значение в формуле (9).

Переносят полученный фильтрат в остродонную колбу вместимостью 50 $см^3$ и упаривают до сухого остатка в вакууме при температуре водяной бани от 40 °С до 45 °С.

Сухой остаток обрабатывают по 5.4.2 или 5.4.3 в зависимости от цели испытания – скринингом проб или количественным определением массовой доли охратоксина А в пробе, в которой при скрининге выявлен пик, идентифицированный как пик охратоксина А.

Примечание – При испытаниях проб, для которых есть основание полагать, что они заражены охратоксином А, допускается сразу переходить к очистке на колонке по 5.4.3, минуя скрининг.

**5.4.2 Проведение скрининга проб**

Сухой остаток, полученный по 5.4.1, растворяют в 0,5 $см^3$ подвижной фазы по 5.3.2.1 и перемешивают 1 мин. Затем добавляют 3 $см^3$ гексана (см. 5.2.17) и снова интенсивно перемешивают. После расслоения двух несмешивающихся между собой фаз аккуратно переносят приблизительно 0,3 $см^3$ нижнего слоя в пробирку для микропроб однократного применения вместимостью 1,5 $см^3$ (пробирка типа Эппендорф) или аналогичную.

Регистрируют хроматограмму полученного раствора по 5.4.4 в день проведения испытаний. Если на хроматограмме обнаруживают пик, идентифицируемый программным обеспечением к хроматографу как пик охратоксина А, то повторяют испытания пробы, включив в обязательном порядке очистку по 5.4.3.

При отсутствии пика, идентифицируемого как пик охратоксина А, делают вывод об отсутствии охратоксина А в пробе на уровне нижней границы диапазона измерений (0,0025 $млн^{-1}$).

**5.4.3 Очистка пробы и приготовление ее концентрата**

Сухой остаток по 5.4.1 растворяют в 1 $см^3$ хлороформа.

Подготавливают стеклянную колонку по 5.3.4. Дают хлороформу стечь до уровня безводного сернокислого натрия и наносят на колонку полученный раствор. Остродонную колбу, в которой проводили упаривание экстракта, ополаскивают два раза по 1 $см^3$ хлороформа, который также наносят на колонку. После этого промывают колонку 10 $см^3$ гексана, элюат отбрасывают.

Затем через колонку пропускают 30 $см^3$ смеси хлороформа с муравьиной кислотой (см. 5.3.2.3) со скоростью не более чем одна капля в секунду, элюируя охратоксин А. Весь элюат собирают в остродонную колбу и упаривают до сухого остатка в вакууме при температуре водяной бани от 40 °С до 45 °С.

Сухой остаток растворяют в 0,5 $см^3$ подвижной фазы (см. 5.3.2.1) и перемешивают 1 мин. Затем добавляют 3 $см^3$ гексана и снова интенсивно перемешивают. После расслоения двух несмешивающихся между собой фаз аккуратно переносят приблизительно 0,3 $см^3$ нижнего слоя в пробирку для микропроб однократного применения вместимостью 1,5 $см^3$ (пробирка типа Эппендорф) или аналогичную. Полученный концентрат используют для хроматографических измерений по 5.4.4 в день проведения испытаний.

Примечание – Приведенные объемы элюирования следует изменить в соответствии со значениями, полученными при определении коэффициента прохождения охратоксина А (см. 5.3.10).

**5.4.4 Проведение хроматографических измерений**

Регистрируют не менее двух хроматограмм концентрата испытуемой пробы, полученного по 5.4.3, в тех же условиях, при которых была проведена градуировка системы. 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 А.1 (приложение А).

При наличии на хроматограмме концентрата пробы пика, идентифицированного как пик охратоксина А, делают вывод о присутствии охратоксина А в пробе, определяют его содержание по каждой зарегистрированной хроматограмме и проверяют расхождение полученных значений между собой, используя формулу (2).

Если условие формулы (2) выполняется, то в качестве результата измерений массовой концентрации охратоксина А в концентрате испытуемой пробы принимают среднеарифметическое значение полученных концентраций. Если условие формулы (2) не выполняется, то находят и устраняют причины нестабильности, после чего ввод концентрата пробы повторяют.

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 доля охратоксина А в пробе должна увеличиться на 50 % –150 % по сравнению с исходным значением.

Если массовая концентрация охратоксина А в конечном концентрате $C_X$ превышает 100 нг/см$^3$, то его разбавляют подвижной фазой (см. 5.3.2.1). Коэффициент разбавления $Q$ вычисляют по формуле

$$Q = \frac{V_p}{V_a}, \qquad (8)$$

где $V_p$ – объем разбавленного концентрата испытуемой пробы, см$^3$;

$V_a$ – объем аликвоты исходного концентрата испытуемой пробы, взятый для разбавления, см$^3$.

**5.5 Обработка результатов испытаний**

Массовую долю охратоксина А в пробе $X$, млн$^{-1}$, вычисляют по формуле

$$X = \frac{V_1 \cdot V_2 \cdot C_X}{V_3 \cdot m \cdot \eta} \cdot Q \cdot 10^{-3}, \qquad (9)$$

где $V_1$ – объем хлороформа, взятого для экстракции, см$^3$ (30 см$^3$);

$V_2$ – объем конечного концентрата пробы, см$^3$ (0,5 см$^3$);

$C_X$ – массовая концентрация охратоксина А в конечном концентрате пробы (см. 5.4.4), нг/см$^3$;

$V_3$ – объем хлороформного экстракта, взятого для испытаний по 5.4.3, см$^3$ (20 см$^3$);

$m$ – масса навески, г;

$\eta$ – коэффициент прохождения охратоксина А (см. 5.3.10);

$Q$ – коэффициент разбавления концентрата пробы (см. 5.4.4);

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

**5.6 Метрологические характеристики**

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

Таблица 2

| Диапазон измерений, млн$^{-1}$ | Предел повторяемости $r^*$, млн$^{-1}$ | Предел воспроизводимости $R$, млн$^{-1}$ | Показатель точности (границы** абсолютной погрешности при доверительной вероятности $P$ = 0,95), $\pm\Delta$, млн$^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| От 0,0025 до 0,05 включ. | 0,28$X$ | 0,42$X$ | 0,30$X$ |
| Св. 0,05 » 1,0 » | 0,18$X$ | 0,31$X$ | 0,22$X$ |

$^*$ $X$ – результат измерений по 5.5, млн-1.

** Установленные числовые значения границ абсолютной погрешности соответствуют числовым значениям расширенной неопределенности U (в абсолютных единицах) при коэффициенте охвата $k$ = 2.

Расхождение между двумя результатами измерений ($X_1$ и $X_2$, млн$^{-1}$), полученными в одной лаборатории в условиях повторяемости, должно соответствовать условию

$$|X_1 - X_2| \le r, \qquad (10)$$

где $r$ – предел повторяемости, млн$^{-1}$ (таблица 2).

При выполнении условия (10) за результат измерений принимают среднеарифметическое полученных результатов измерений ($X_1$ и $X_2$, млн$^{-1}$).

Расхождение между двумя результатами измерений, полученными в двух лабораториях ($X_{1лаб}$ и $X_{2лаб}$, млн$^{-1}$) на идентичных пробах, должно соответствовать условию

$$|X_{1лаб} - X_{2лаб}| \le R, \qquad (11)$$

где $R$ – предел воспроизводимости, млн$^{-1}$ (таблица 2).

**5.7 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).

**5.8 Оформление результатов испытаний**

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

$$\bar{X} \pm \Delta, \text{ млн}^{-1} \quad \text{либо} \quad \bar{X} \pm U, \text{ млн}^{-1}, \qquad (12)$$

где $\overline{X}$ – результат измерений, полученный в соответствии с 5.6, млн$^{-1}$;

$\Delta$ – границы абсолютной погрешности измерений содержания охратоксина А ($P$ = 0,95) по таблице 2, млн$^{-1}$;

$U$ – расширенная неопределенность при коэффициенте охвата $k$ = 2, млн$^{-1}$.

Числовые значение 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).

## 6 Метод Б

**6.1 Сущность метода**

Метод основан на экстракции охратоксина А толуолом после подкисления испытуемой пробы соляной кислотой и добавления хлорида магния для увеличения ионной силы. Экстракт очищают с использованием колонок для твердофазной экстракции, заполненных силикагелем, и определяют содержание охратоксина А методом ВЭЖХ на обращенно-фазовой колонке с применением флуориметрического детектирования. При необходимости проводят подтверждение идентификации охратоксина А путем дериватизации раствором трифторида бора в метаноле.

**6.2 Реактивы**

При проведении испытаний используют воду по 5.2.13, реактивы по 5.2.14 – 5.2.17, а также нижеследующие.

6.2.1 Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч., раствор молярной концентрации $c$ (HCl) = 2 моль/дм$^3$.

Для приготовления раствора к пяти объемным частям воды осторожно приливают при сильном перемешивании одну объемную часть концентрированной соляной кислоты.

6.2.2 Магний хлористый 6-водный по ГОСТ 4209, ч. д. а., раствор молярной концентрации $c$ ($MgCl_2$) = 0,4 моль/дм$^3$.

Для приготовления раствора (8,13 ± 0,01) г магния хлористого 6-водного растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до 100 см$^3$ в мерной колбе.

6.2.3 Толуол по ГОСТ 5789, ч. д. а.

6.2.4 Хлористый метилен по ГОСТ 9968.

6.2.5 Ацетон по ГОСТ 2603, ч. д. а.

6.2.6 Метанол по ГОСТ 6995, х. ч.

6.2.7 Растворитель смешанный № 1: толуол (см. 6.2.3) и уксусная кислота ледяная (см. 5.2.15) в объемном соотношении 99 : 1.

6.2.8 Растворитель смешанный № 2: ацетон (см. 6.2.5) и толуол (см. 6.2.3) в объемном соотношении 5 : 95.

6.2.9 Растворитель смешанный № 3: толуол (см. 6.2.3) и уксусная кислота ледяная (см. 5.2.15) в объемном соотношении 90 : 10.

**6.2.10 Подвижная фаза**

Смешивают 99 объемных частей ацетонитрила (см. 5.2.16) с 99 объемными частями воды (см.5.2.13) и двумя объемными частями ледяной уксусной кислоты (см. 5.2.15). Перед употреблением подвижную фазу дегазируют.

6.2.11 Трифторид бора, массовая доля основного вещества не менее 99 %.

6.2.12 Раствор трифторида бора в метаноле, $\rho$ ($BF_3$) = 14 г/100 см$^3$.

**ВНИМАНИЕ! Работать необходимо в хорошо действующем вытяжном шкафу. Следует избегать попадания на кожу, в глаза и органы дыхания.**

6.2.13 Охратоксин А в кристаллической форме или в виде ампульного препарата в пленочной форме с массовой долей основного вещества не менее 95 %

**6.2.14 Охратоксин А, исходный раствор**

Растворяют 1 мг кристаллического охратоксина А (см. 6.2.13) или содержимое ампулы с пленкой, содержащей охратоксин А, в таком объеме смешанного растворителя № 1 (см. 6.2.7), чтобы получить раствор массовой концентрации охратоксина А от 20 до 30 мкг/см$^3$.

Для определения точного значения массовой концентрации охратоксина А в основном растворе регистрируют его оптическую плотность в диапазоне длин волн от 300 до 370 нм с шагом 5 нм в кварцевой кювете с толщиной оптического слоя 1 см по 6.3.2 с использованием спектрофотометра (см. 6.3.1). В качестве раствора сравнения используют смешанный растворитель № 1 по 6.2.7. Идентифицируют точное положение максимума поглощения, регистрируя оптическую плотность вблизи него с шагом 1 нм. Рассчитывают значение массовой концентрации охратоксина А, $C_{исх}$, мкг/см$^3$, по формуле

$$C_{исх} = A_{макс} \cdot \frac{M \cdot 100}{\varepsilon \cdot l}, \qquad (13)$$

где $A_{макс}$ – оптическая плотность в максимуме поглощения (в данном случае при 333 нм);

$M$ – молярная масса охратоксина А, г/моль (М=403,8 г/моль);

100 – коэффициент согласования единиц длины и массы;

$\varepsilon$ – молярный коэффициент поглощения охратоксина А в смешанном растворителе № 1, м$^2$/моль, ($\varepsilon$ = 544 м$^2$/моль);

$l$ – толщина поглощающего слоя кюветы, см.

**6.2.15 Охратоксин А, промежуточный раствор массовой концентрации 1 мкг/см$^3$**

Упаривают досуха в токе азота аликвоту исходного раствора (см. 6.2.14), содержащую 100 мкг охратоксина А, и растворяют в 100 см$^3$ подвижной фазы (см. 6.2.10). Объем аликвоты вычисляют по формуле:

$$V_a = \frac{100}{C_{исх}}, \qquad (14)$$

где $V_a$ – объем аликвоты, см$^3$;

100 – масса охратоксина А, мкг;

$C_{исх}$ – массовая концентрация исходного раствора охратоксина А по 6.2.14, мкг/см$^3$.

Срок хранения раствора в холодильнике при температуре от 2°С до 6°С и регулярном контроле его стабильности – не более 6 мес.

**6.2.16 Градуировочные растворы охратоксина А**

В мерные колбы вместимостью 100 $см^3$ помещают 1; 2,5; 4 и 5 $см^3$ промежуточного раствора охратоксина А (см.6.2.15) и разбавляют до метки подвижной фазой (см. 6.2.10). Массовая концентрация охратоксина А в приготовленных градуировочных растворах составляет 10; 25; 40 и 50 $нг/см^3$ соответственно, что соответствует массе охратоксина А 0,2; 0,5; 0,8 и 1,0 нг в объеме дозирования 20 $мм^3$.

**6.3 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и посуда**

При проведении испытаний используют средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и посуду по 5.2.1 – 5.2.2, 5.2.6 – 5.2.11, 5.2.21 –5.2.34, а также нижеследующее.

6.3.1 Спектрофотометр, пригодный для измерений в диапазоне длин волн от 300 до 370 нм и имеющий спектральную ширину полосы не более 2 нм.

6.3.2 Кюветы кварцевые с толщиной поглощающего слоя 1 см, не поглощающие свет в диапазоне длин волн от 300 до 370 нм.

6.3.3 Пробирки центрифужные, например вместимостью 250 $см^3$, выполненные из полиэтилена высокого давления с завинчивающейся крышкой.

6.3.4 Центрифуга с охлаждением, желательно рефрижераторная, для центрифужных пробирок (см. 6.3.3), способная к созданию ускорения не менее 3500 g.

Примечание – Скорость вращения центрифуги, обеспечивающую указанное ускорение, выбирают в соответствии с рекомендациями изготовителя центрифуги.

6.3.5 Колонка для твердофазной экстракции одноразовая, заполненная силикагелем.

После вскрытия упаковки колонку кондиционируют в течение двух часов при температуре 105 °С и хранят над активированным силикагелем с индикатором влажности. Перед использованием через колонку пропускают 10 $см^3$ толуола (см. 6.2.3). С каждой новой партией колонок проверяют выход охратоксина А. Например, пригодны колонки, выполненные из полипропиленовой трубки вместимостью 3 $см^3$, со следующими характеристиками:

- средняя масса силикагеля - 690 мг;
- размер пор - 12,5 нм;
- размер частиц - от 55 до 105 мкм.

6.3.6 Резервуары для растворителей, такие как шприцы вместимостью например 50 $см^3$ с центральным отверстием и пробкой.

6.3.7 Воронка делительная вместимостью 50 $см^3$ по ГОСТ 25336.

6.3.8 Фильтры мембранные для водных растворов, выполненные из политетрафторэтилена, с размером пор 0,45 мкм.

6.3.9 Виалы с обжимной или завинчивающейся крышкой.

6.3.10 Микрошприц вместимостью 500 $мм^3$.

**6.3.11 Аппаратура для высокоэффективной жидкостной хроматографии**

6.3.11.1 Хроматограф жидкостный по 5.2.1.

6.3.11.2 Колонка хроматографическая аналитическая, заполненная обращенно-фазовым сорбентом зернением 5 мкм, обеспечивающая разделение пика охратоксина А и остальных пиков до базовой линии*со следующими характеристиками:

- длина.....250 мм;
- внутренний диаметр.....4 мм;
- размер сферических частиц .....5 мкм.

Примечание – Допускается использование аналитических колонок иных типоразмеров (например длиной от 120 до 150 мм).

6.3.11.3 Предколонка того же внутреннего диаметра и заполненная тем же обращенно-фазовым сорбентом, что и аналитическая колонка длиной 40 мм.

Примечание – Допускается использование предколонок иных типоразмеров.

6.3.11.4 Предколонка того же внутреннего диаметра и заполненная тем же обращенно-фазовым сорбентом, что и аналитическая колонка, например, со следующими характеристиками:

---

* Например, колонка Lichrospher® 100 RP 18, являющаяся примером коммерческого продукта, удовлетворяющего указанным требованиям. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является поддержкой указанного продукта.

- длина.....40 мм;
- внутренний диаметр.....4 мм;
- размер сферических частиц.....5 мкм.

Примечание – Допускается использование предколонок иных типоразмеров.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и вспомогательного оборудования с техническими характеристиками не хуже, а также материалов и реактивов по качеству не ниже вышеуказанных.

**6.4 Проведение испытаний**

**6.4.1 Общие положения**

Испытания должны быть проведены в течение одного рабочего дня.

**6.4.2 Экстракция охратоксина А из пробы**

Помещают (20,0 ± 0,1) г пробы, подготовленной к испытаниям в соответствии с разделом 3, в центрифужную пробирку (см. 6.3.3). При ожидаемом содержании охратоксина более 0,005 млн$^{-1}$ массу пробы уменьшают до 10 г; в противном случае следует принять во внимание возможный риск уменьшения извлечения охратоксина А из пробы.

Последовательно добавляют 30 см$^3$ раствора соляной кислоты (см. 6.2.1), 50 см$^3$ раствора хлористого магния (см. 6.2.2), перемешивают стеклянной палочкой и добавляют 100 см$^3$ толуола по 6.2.3 ($V_1$).

Перемешивают в течение 60 мин и затем центрифугируют суспензию. Время центрифугирования зависит от эффективности центрифуги. Центрифугирование проводят при охлаждении для предотвращения потерь толуола. Отбирают аликвоту верхнего (толуольного) слоя объемом 50 см$^3$ ($V_2$) и пропускают ее через колонку для твердофазной экстракции, подготовленную по 6.3.5, с подсоединенным к ней резервуаром (см. 6.3.6).

Примечание – Следует принять меры по недопущению перегрузки колонки.

Колонку промывают двумя порциями по 10 см$^3$ гексана (см. 5.2.17) и затем двумя порциями смешанного растворителя № 2 (см. 6.2.8). Затем промывают 5 см$^3$ толуола, отбрасывая все элюаты.

Элюируют охратоксин А двумя порциями по 15 см$^3$ смешанного растворителя № 3 (см. 6.2.9) в остродонную колбу вместимостью 50 см$^3$ (см. 5.2.25). Объединенный элюат осторожно упаривают до сухого остатка при пониженном давлении и температуре не выше 40 °С. Остаток растворяют в 1 см$^3$ ($V_3$) подвижной фазы (см. 6.2.10) и переносят в виалу (см. 6.3.9).

Примечания

1 Условия элюирования охратоксина А и последующих операций могут зависеть от типа применяемых колонок для твердофазной экстракции. Например, следует проверить, соответствует ли указанный выше объем элюента применяемому типу колонок.

2 Размеры и/или форма колбы могут оказывать негативное влияние на выход охратоксина А.

**6.4.3 Условия хроматографического анализа**

Если применяют колонку по 6.3.11.2 и подвижную фазу по 6.2.10, то хроматографический анализ проводят в следующих условиях:

- скорость потока подвижной фазы .....1 см$^3$/мин;
- длина волны возбуждения флуоресценции.....330 нм;
- длина волны регистрации флуоресценции.....460 нм;
- объем дозирования.....20 мм$^3$.

**6.4.4 Градуировка хроматографа**

Градуировку хроматографа проводят при освоении методики и в дальнейшем во всех случаях, когда изменяются условия хроматографического анализа.

Вводят в хроматограф по меньшей мере четыре градуировочных раствора с разными значениями массовой концентрации охратоксина А (см. 6.2.16). Объем дозирования каждого градуировочного раствора должен быть одним и тем же.

Устанавливают градуировочную характеристику как зависимость площади или высоты пика от массы охратоксина А в инжектируемом объеме.

Проверяют линейность установленной градуировочной характеристики, используя коэффициент корреляции (см. 5.3.7). Ежедневно перед началом работы проводят контроль стабильности градуировочной характеристики аналогично 5.3.8, используя при этом градуировочный раствор охратоксина А массовой концентрации 25 нг/см$^3$ (см. 6.2.16).

**6.4.5 Идентификация охратоксина А**

Пик охратоксина А идентифицируют путем сравнения значений времени удерживания пиков на хроматограмме пробы и градуировочных растворов. В некоторых случаях может потребоваться ввод пробы с добавкой раствора охратоксина А в подвижной фазе (см. 5.4.4).

**6.4.6 Количественное определение**

Подготовленный по 6.4.2 раствор пробы сразу же вводят в хроматограф. Объем дозирования должен быть равен объему дозирования градуировочных растворов при проведении градуировки хроматографа (см. 6.4.4).

Измеряют площадь или высоту пика охратоксина А на хроматограмме пробы и при помощи градуировочной характеристики (см. 6.4.4) находят его массу ($m_1$, нг) в инжектируемом объеме.

Если значение отклика охратоксина А на хроматограмме пробы выходит за пределы градуировочной характеристики, то подготовленный раствор пробы разбавляют или концентрируют перед вводом в хроматограф, учитывая этот факт при расчете результатов измерений по 6.5.

**6.4.7 Подтверждение**

При необходимости подтверждают идентификацию пика охратоксина А по его исчезновению и одновременному появлению пика со временем удерживания, совпадающим с временем удерживания пика метилового эфира охратоксина А в результате дериватизации с трифторидом бора.

Отбирают 0,5 см$^3$ раствора, приготовленного по 6.4.2, в остродонную колбу, упаривают до сухого остатка на ротационном испарителе (см. 5.2.7). Сухой остаток растворяют в 1 см$^3$ хлористого метилена (см. 6.2.4) и добавляют 2 см$^3$ раствора трифторида бора в метаноле (см. 6.2.12).

Колбу плотно закрывают пробкой и нагревают на водяной бане при температуре от 50 °С до 60 °С в течение 15 мин. После охлаждения раствор переносят в делительную воронку вместимостью 50 см$^3$, содержащую 30 см$^3$ воды, встряхивают по 30 с тремя порциями хлористого метилена по 10 см$^3$ каждая. Объединяют органические фазы после каждой экстракции в другой делительной воронке вместимостью 50 см$^3$, добавляют для промывания 20 см$^3$ воды и встряхивают в течение 30 с.

Фильтруют органическую фазу через слой безводного сернокислого натрия (см. 5.2.14) в остродонную колбу, упаривают до сухого остатка, растворяют в 500 мм$^3$ подвижной фазы (см. 6.2.10) и регистрируют хроматограмму полученного раствора в условиях по 6.4.3.

Для нахождения времени удерживания метилового эфира охратоксина А и проверки полноты дериватизации в указанных выше условиях проводят обработку промежуточного раствора по 6.2.15.

**6.5 Обработка результатов испытаний**

Массовую долю охратоксина А $X$, млн$^{-1}$ вычисляют по формуле

$$X = \frac{V_1 \cdot V_3 \cdot m_1}{V_2 \cdot V_4 \cdot m} \cdot 10^{-3}, \qquad (15)$$

где $V_1$ – объем толуола, взятый для экстракции по 6.4.2, см$^3$ (100 см$^3$);

$V_3$ – объем раствора пробы, подготовленного по 6.4.2, см$^3$ (1 см$^3$);

$m_1$ – масса охратоксина А, установленная по 6.4.6, нг;

$V_2$ – объем аликвоты центрифугата по 6.4.2, см$^3$ (50 см$^3$);

$V_4$ – объем дозирования подготовленного раствора пробы, см$^3$;

$m$ – масса пробы, взятой для испытаний, г;

$10^{-3}$ - коэффициент согласования размерности единиц массы.

**6.6 Метрологические характеристики**

6.6.1 Результаты межлабораторных испытаний по определению точности метода, проведенных в соответствии с ГОСТ ISO 5725-2, приведены в Приложении Б. Значения, полученные в результате межлабораторных испытаний могут быть не применимы в диапазонах содержаний охратоксина А и для матриц, отличающихся от указанных в приложении Б.

6.6.2 Абсолютное расхождение между двумя результатами единичных испытаний, полученными в условиях повторяемости может превышать предел повторяемости $r$ не более чем в 5 % случаев.

Значения пределов повторяемости $r$ при анализе пшеничной муки из цельного зерна:

$r$=0,18 мкг/кг (0,00018 млн$^{-1}$) при $\overline{X}$ =0,41 мкг/кг (0,00041 млн$^{-1}$);

$r$=0,70 мкг/кг (0,00070 млн$^{-1}$) при $\overline{X}$ =1,23 мкг/кг (0,00123 млн$^{-1}$).

6.6.3 Абсолютное расхождение между двумя результатами единичных испытаний, полученными в условиях воспроизводимости может превышать предел воспроизводимости $R$ не более чем в 5 % случаев.

Значения пределов воспроизводимости $R$ при анализе пшеничной муки из цельного зерна:

$R$=0,30 мкг/кг (0,00030 млн$^{-1}$) при $\overline{X}$ =0,41 мкг/кг (0,00041 млн$^{-1}$);

$R$=1,10 мкг/кг (0,00110 млн$^{-1}$) при $\overline{X}$ =1,23 мкг/кг (0,00123 млн$^{-1}$).

6.7 Контроль качества результатов измерений – по 5.7.

6.8 Оформление результатов испытаний – по 5.8.

**Приложение А**
**(справочное)**

## Пример хроматограммы

А.1 На рисунке А.1 приведен пример хроматограммы (метод А) концентрата стандартного образца OW-815 «Охратоксин А в молотой пшенице», изготовленного компанией R-Biopharm Rhone Ltd. с массовой долей охратоксина А (0,0049 ± 0,0010) млн$^{-1}$.

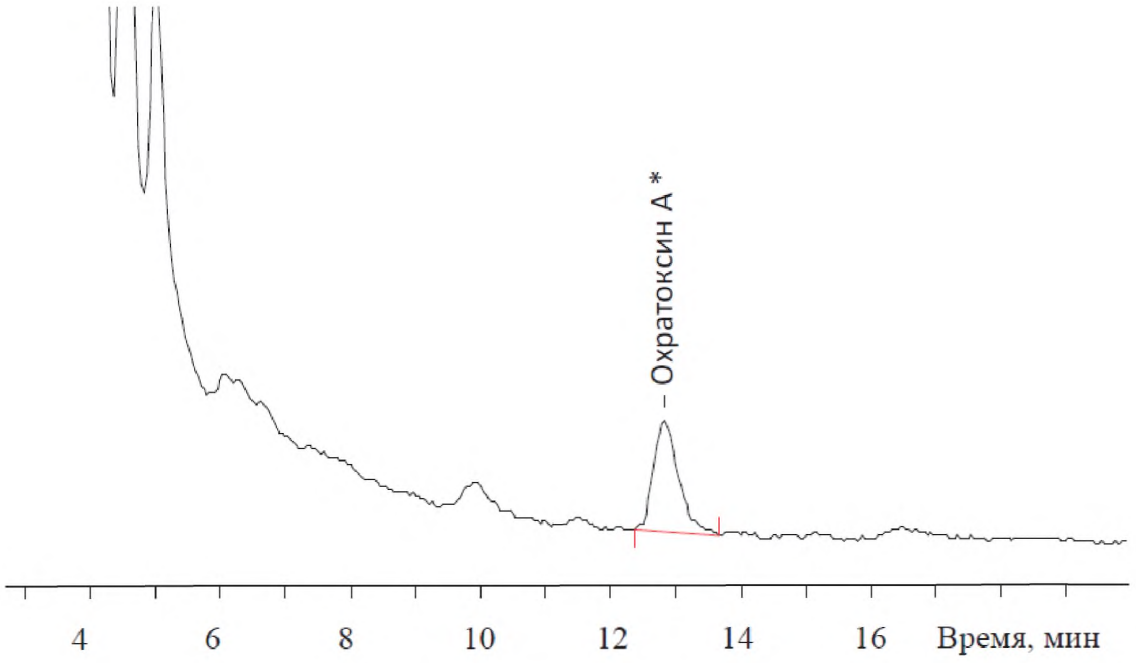


Рисунок А.1 – Пример хроматограммы

* Пик соответствует содержанию охратоксина А, равному 0,0042 млн$^{-1}$.

## Приложение Б
## (справочное)

## Данные по прецизионности

Б.1 Приведенные в таблице Б.1 данные получены в результате межлабораторных испытаний, проведенных для метода Б в соответствии с ГОСТ ИСО 5725-2 Институтом имени Макса фон Петтенкофера (Берлин, Германия) на пробах пшеничной муки.

Т а б л и ц а Б.1 – Данные по прецизионности методики

| Наименование показателя | Мука пшеничная 1991 | Мука пшеничная 1993 | |
|---|---|---|---|
| Число лабораторий | | 13 | 13 |
| Число проб | | 1 | 1 |
| Число лабораторий, оставшихся после исключения выбросов | | 13 | 13 |
| Число выбросов | | 0 | 0 |
| Число принятых результатов | | 65 | 65 |
| Среднее значение $\bar{X}$, мкг/кг | | 1,227 | 0,407 |
| Стандартное отклонение повторяемости $s_r$, мкг/кг | | 0,248 | 0,062 |
| Относительное стандартное отклонение повторяемости $RSD_r$ | | 20,21 % | 15,32 % |
| Предел повторяемости $r$, мкг/кг | | 0,702 | 0,176 |
| Стандартное отклонение воспроизводимости $s_R$, мкг/кг | | 0,388 | 0,105 |
| Относительное стандартное отклонение воспроизводимости $RSD_R$ | | 31,62 % | 25,80 % |
| Предел воспроизводимости $R$, мкг/кг | | 1,097 | 0,298 |
| Выход | | (80 ± 15) % | (90 ± 15) % |

УДК 543.544.5.068.7:006.354 МКС 67.060 65.120 NEQ

Ключевые слова: зерно, зерно продовольственное, зерно фуражное, комбикорма, продукты переработки зерна, методы испытаний, хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, охратоксин А, микотоксины

Подписано в печать 14.04.2016. Формат 60x84 1/8.

Усл. печ. л. 2,33. Тираж 22 экз. Зак. 1070.

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