МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 28038– 2013

ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ ПЛОДОВ И ОВОЩЕЙ

Методы определения микотоксина патулина

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Поправка к ГОСТ 8.332—2013, ГОСТ 12.2.121—2013, ГОСТ 12.2.122—2013, ГОСТ 108—2014, ГОСТ 490—2006, ГОСТ 745—2014, ГОСТ 1760—2014, ГОСТ 4570—2014, ГОСТ 4974—2014, ГОСТ 5312—2014, ГОСТ 6034—2014, ГОСТ 10444.12—2013, ГОСТ 14138—2014, ГОСТ 21715—2013, ГОСТ 26602.1—99, ГОСТ 26602.2—99, ГОСТ 26602.3—99, ГОСТ 28038—2013, ГОСТ 30324.0.4—2002 (МЭК 60601-1-4:1996), ГОСТ 30324.30—2002 (МЭК 60601-2-30:1995), ГОСТ 30324.35—2002 (МЭК 60601-2-35:1996), ГОСТ 30324.2.41—2012 (IEC 60601-2-41:2000), ГОСТ 30324.2.47—2012 (IEC 60601-2-47:2001), ГОСТ 30494—2011, ГОСТ 31622—2012, ГОСТ 31624—2012, ГОСТ 31698—2013, ГОСТ 32283—2013, ГОСТ 32572—2013, ГОСТ 32573—2013, ГОСТ 32574—2013, ГОСТ 32782—2014, ГОСТ 32930—2014, ГОСТ ISO 5833—2011

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Предисловие	—	Узбекистан | UZ | Узстандарт

(ИУС № 7 2016 г.)

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 Некоммерческой организацией «Российский союз производителей соков» (РСПС) при участии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт питания» Российской Академии медицинских наук (ФГБУ «НИИ питания» РАМН) и закрытого акционерного общества «Мултон»

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (ТК 335)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 марта 2013 г. № 55-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004 – 97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004 – 97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минторгэкономразвития
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 28 июня 2013 г. № 310-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 28038–2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2014 г.

5 В разделе 6 настоящего стандарта учтены основные положения документа Рекомендации № 02 «Определение патулина» [IFU Recommendation No. 2 «Determination of Patulin», Revised in 2005 Международной федерации производителей соков (International Federation of Fruit Juice Producers – IFU)]

6 ВЗАМЕН ГОСТ 28038–89

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, 2014

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

Введение

При подготовке настоящего стандарта учитывались действующие международные, межгосударственные стандарты, правила, постановления и законы.

В стандарте описаны методы определения массовой концентрации (массовой доли) микотоксина патулина: метод тонкослойной хроматографии и метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее – ВЭЖХ).

В терминологических статьях в круглых скобках приведены эквиваленты терминов на английском языке.

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

ПРОДУКТЫ ПЕРЕРАБОТКИ ПЛОДОВ И ОВОЩЕЙ

Методы определения микотоксина патулина

Fruit and vegetable products.
Methods for determination of micotoxin patulin

Дата введения – 2014–07–01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на продукты переработки плодов и овощей, в том числе на соковую продукцию: фруктовые соки и нектары, фруктовые концентрированные соки, фруктовые пюре и концентрированные пюре, морсы и концентрированные морсы, сокосодержащие напитки, соковую продукцию обогащенную и для детского питания, и устанавливает следующие методы определения массовой концентрации (массовой доли) микотоксина патулина:

- метод тонкослойной хроматографии;
- метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее – ВЭЖХ).

Нижний предел определения массовой концентрации (массовой доли) патулина методом тонкослойной хроматографии – 10 мкг/дм^3 ($10 \cdot 10^{-7}$ %).

Нижний предел измерений массовой концентрации микотоксина патулина методом ВЭЖХ составляет 10 мкг/дм^3, массовой доли – $10 \cdot 10^{-7}$ %, верхний предел измерений массовой концентрации микотоксина патулина составляет 75 мкг/дм^3, массовой доли – $75 \cdot 10^{-7}$ %.

Предел обнаружения патулина методом ВЭЖХ составляет 1 мкг/дм^3 или $1 \cdot 10^{-7}$ %.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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 12.1.005–88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

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

ГОСТ 12.1.018–93 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

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

ГОСТ 83–79 Реактивы. Натрий углекислый. 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 Реактивы. Ацетон. Технические условия

ГОСТ 3118–77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

Издание официальное

ГОСТ 4166–76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия
ГОСТ 4207–75 Реактивы. Калий железистосинеродистый 3-водный. Технические условия
ГОСТ 4233–77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия
ГОСТ 5556–81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия
ГОСТ 5789–78 Реактивы. Толуол. Технические условия
ГОСТ 5823–78 Реактивы. Цинк уксуснокислый 2-водный. Технические условия
ГОСТ 5848–73 Реактивы. Кислота муравьиная. Технические условия
ГОСТ 5956–78 Суперфосфат гранулированный из апатитового концентрата без добавок и с добавками микроэлементов. Технические условия
ГОСТ 6552–80 Реактивы. Кислота ортофосфорная. Технические условия
ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 9147–80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия
ГОСТ 9293–74 Азот газообразный и жидкий. Технические условия
ГОСТ 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 18300–87 Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия
ГОСТ 19814–74 Кислота уксусная синтетическая и регенерированная. Технические условия
ГОСТ 20015–88 Хлороформ. Технические условия
ГОСТ 20490–75 Реактивы. Калий марганцовокислый. Технические условия
ГОСТ 22300–76 Реактивы. Эфиры этиловый и бутиловый уксусной кислоты. Технические условия
ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. 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 28498–90 Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний
ГОСТ 29227–91 (ИСО 835–1–81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов по указателю «Национальные стандарты», составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. 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 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **микотоксин патулин** (mycotoxin patulin): Поликетидный лактон, вещество, продуцируемое некоторыми грибами родов Penicillium, Aspergillus и Byssochlamys; химическое название: 4-гидрокси-4Н-фуро[2,3-е]пиран-2(6Н)-ОН.

4 Отбор и подготовка проб

Отбор проб – по ГОСТ 26313, подготовка проб – по ГОСТ 26671.

5 Метод тонкослойной хроматографии

5.1 Сущность метода

Метод основан на экстракции патулина из продукта органическим растворителем, очистке экстракта от мешающих веществ и определении патулина с помощью тонкослойной хроматографии. Нижний предел определения патулина – 10 мкг/дм^3 ($10 \cdot 10^{-7}$ %).

5.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы, материалы

Весы лабораторные специального класса точности с наибольшим пределом взвешивания не более 120 г со значением среднеквадратического отклонения (СКО), не превышающим 0,03 мг, и с погрешностью от нелинейности не более ± 0,06 мг.

Весы лабораторные среднего класса точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,01 г.

Спектрофотометр с диапазоном измерения, позволяющим проводить исследования при длине волны 275 нм, с допустимой абсолютной погрешностью измерений коэффициента пропускания не более ±1 %; кюветы кварцевые с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм.

Колонка стеклянная хроматографическая длиной 230 мм и внутренним диаметром 25 мм.

Испаритель ротационный вакуумный.

Насос водоструйный лабораторный по ГОСТ 25336.

Микрошприц градуированный вместимостью 10 мм^3 ценой деления 0,1 мм^3.

Камера для тонкослойной хроматографии с притертой крышкой.

Облучатель ультрафиолетовый лабораторный с ртутно-кварцевой лампой высокого давления, оснащенный оптическим фильтром, отсекающим излучение в видимой части спектра, обеспечивающий освещенность поверхности площадью не менее 250 см^2, интенсивностью излучения, позволяющей надежно визуализировать пятно патулина массой 10 нг.

Термометр жидкостный стеклянный по ГОСТ 28498 с пределами измерения 0 °С – 100 °С и ценой деления шкалы не более 1 °С.

Посуда мерная лабораторная стеклянная по ГОСТ 1770:

цилиндры 1-50-2, 1-100-2;

колбы мерные 4-100-2, 4-250-2, 4-1000-2 и 4-2000-2;

пробирки 1-10-0,1 ХС и 1-20-0,1 ХС.

Пипетки градуированные 1-2-2-1, 1-2-2-2, 1-2-2-5, 1-2-2-10 и 1-2-2-25 по ГОСТ 29227.

Посуда лабораторная стеклянная по ГОСТ 25336:

стаканы В-1-50 и В-1-150;

воронки лабораторные В-56-80 ХС;

воронка делительная с пришлифованной пробкой вместимостью 250 см^3;

колба плоскодонная П-2-250;

колба грушевидная Гр-100-14/23;

колба остродонная О-25-14/23.

Эксикатор по ГОСТ 25336 с краном, с диаметром корпуса 250 мм.

Вставка для эксикатора по ГОСТ 9147 диаметром 230 мм исполнения 2.

Воронка капельная по ГОСТ 25336 вместимостью 50 см^3.

Распылитель стеклянный с грушей.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026 марки Ф.

Вата по ГОСТ 5556.

Силикагель для колоночной хроматографии размером частиц 100–160 мкм или 100–250 мкм.

Пластины для тонкослойной хроматографии на алюминиевой подложке размером 15 × 15 см со слоем силикагеля размером частиц в диапазоне от 5 до 17 мкм.

Патулин ($C_7H_6O_4$) массовой долей основного вещества не менее 95 %.

Хлороформ очищенный высшего сорта по ГОСТ 20015

Спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.

Калий железистосинеродистый 3-водный по ГОСТ 4207, х. ч., раствор концентрации 150 г/дм^3 (раствор Карреза I).

Цинк уксуснокислый 2-водный по ГОСТ 5823, ч. д. а., раствор концентрации 300 г/дм^3 (раствор Карреза II).

Эфир этиловый уксусной кислоты по ГОСТ 22300, ч. д. а. (этилацетат).

Ацетон по ГОСТ 2603, х. ч.

Толуол по ГОСТ 5789, ч. д. а.

Кислота муравьиная по ГОСТ 5848, ч. д. а.

Бензидин массовой долей основного вещества не менее 95 %, раствор в муравьиной кислоте массовой концентрацией 5 г/дм^3.

Азот чистотой не менее 99 %, сжатый газ в баллоне, снабженном редуктором с гибким шлангом, на конце которого имеется стеклянный, пластиковый или металлический наконечник диаметром выходного отверстия 0,5 - 1 мм.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.

Натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4166, прокаленный, х. ч.

Калий марганцовокислый по ГОСТ 20490, х. ч., раствор массовой концентрацией 15 г/дм^3.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Бензол по ГОСТ 5956, ч. д. а.

Ацетонитрил массовой долей основного вещества не менее 99,5 %

Патулин ($C_7H_6O_4$), стандартный образец состава раствора патулина в смеси бензола с ацетонитрилом аттестованным значением массовой концентрации 10,0 мкг/см^3 и относительной погрешностью аттестованного значения массовой концентрации не более ± 5 %.

Допускается использование пластин для тонкослойной хроматографии меньшего размера при условии, что они обеспечивают отделение пятна патулина от пятен других компонентов матрицы пробы в условиях хроматографического анализа по 5.4.4.

Все растворители, используемые при выполнении операций экстракции и очистки экстракта, проверяют на пригодность путем проведения холостого испытания по 5.4.6 и, в случае выявления их непригодности, подвергают дополнительной очистке дистилляцией или другими способами.

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

5.3 Подготовка к проведению определения

5.3.1 Приготовление градуировочного (основного) раствора патулина

В качестве градуировочного раствора рекомендуется использовать стандартный образец состава раствора патулина в смеси бензола с ацетонитрилом. При отсутствии стандартного образца состава раствора патулина градуировочный раствор готовят следующим образом.

В стакан помещают навеску патулина массой около 5 мг и пипеткой добавляют 10 см^3 смеси бензола с ацетонитрилом (9:1). Содержимое стакана аккуратно взбалтывают до полного растворения кристаллов патулина и переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3. Стакан ополаскивают еще двумя порциями по 10 см^3 смеси бензола с ацетонитрилом (9:1), каждый раз перенося содержимое в ту же мерную колбу. Объем в колбе доводят до метки смесью бензола с ацетонитрилом (9 : 1), содержимое тщательно перемешивают. 20 см^3 полученного раствора пипеткой переносят в другую мерную колбу такой же вместимости. Объем в колбе доводят до метки смесью бензола с ацетонитрилом (9:1), содержимое тщательно перемешивают. Полученный градуировочный раствор хранят в холодильнике в закрытом сосуде. Срок годности раствора патулина – 6 мес.

Точную концентрацию патулина градуировочном растворе определяют спектрофотометрическим методом. Для этого пипеткой 6,0 см^3 градуировочного раствора переносят в отгонную колбу. Раствор выпаривают на ротационном испарителе при температуре не выше 40 °С до объема около 0,5 см^3, остаток растворителя удаляют в слабом токе азота при комнатной температуре. Сухой остаток растворяют в 9,0 см^3 этилового спирта и определяют оптическую плотность полученного раствора в кювете с рабочей длиной 1 см по отношению к контрольному раствору на спектрофотометре при длине волны 275 нм. В качестве контрольного раствора используют этиловый спирт.

Массовую концентрацию патулина в градуировочном растворе C, мкг/см^3, вычисляют по формуле

$$C = \frac{MDK_1K_2}{\varepsilon l} \cdot 10^3 \ , \qquad (1)$$

где M – молярная масса патулина, M= 154 г/моль;

D – оптическая плотность раствора;

K_1 – коэффициент разведения, K_1= 1,5;

K_2 – поправочный коэффициент к спектрофотометру, определяемый по приложению А;

l – рабочая длина кюветы, см;

ε – молярный показатель поглощения раствора патулина при длине волны 275 нм, (ε = 1,46 ·10^4 дм^3 ·моль$^{-1}$ ·см$^{-1}$).

5.4. Проведение испытания

5.4.1 Приготовление водной вытяжки из пробы

Пробу для анализа соков и сокосодержащих напитков объемом 50,0 см^3, соков с мякотью и пюре массой 50,0 г, повидла, джема, варенья, фруктового порошка массой 25,0 г помещают в стек-

лянный стакан, смешивают с небольшим количеством дистиллированной воды и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 см^3. В мерную колбу вносят 15 см^3 раствора Карреза I и 15 см^3 раствора Карреза II. Содержимое колбы доводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают и фильтруют в мерный цилиндр через бумажный складчатый фильтр.

5.4.2 Экстракция

Цилиндром отмеряют 50 см^3 фильтрата и переносят его в делительную воронку. Этим же цилиндром отмеряют 50 см^3 этилацетата, переносят его в делительную воронку и в течение 1 мин интенсивно перемешивают содержимое. Смеси дают отстояться и после полного разделения водный нижний слой сливают обратно в цилиндр, а этилацетатный экстракт переносят в сухую плоскодонную колбу. Экстрагирование остатков патулина из водной фазы проводят еще раз в аналогичных условиях свежей порцией этилацетата. При этом после одноминутного перемешивания в делительную воронку вносят 10 г хлористого натрия и продолжают перемешивать еще в течение 0,5 мин. После разделения слоев водную фазу отбрасывают, а объединенные этилацетатные экстракты обезвоживают в плоскодонной колбе добавлением 15-20 г сернокислого натрия. После обезвоживания экстракт фильтруют через ватный тампон в отгонную грушевидную колбу. Оставшийся сернокислый натрий ополаскивают двумя порциями этилацетата объемом по 10 см^3, которые затем также фильтруют в отгонную колбу. Экстракт выпаривают на ротационном испарителе при температуре не выше 40 °С до объема около 1 см^3.

5.4.3 Очистка экстракта

На дно стеклянной колонки помещают ватный тампон, поверх которого насыпают слой сернокислого натрия толщиной 5 мм. В колонку вносят суспензию 2 г силикагеля с 15 см^3 бензола. Не давая просохнуть слою силикагеля, поверх него насыпают слой сернокислого натрия толщиной 10 мм. Бензолу дают стечь, после чего на верхний слой сернокислого натрия наносят экстракт, подготовленный по 5.4.2. Экстракту дают полностью впитаться в фильтрующий слой. Отгонную колбу ополаскивают 0,5 см^3 этилацетата, смыв переносят на колонку и дают ему полностью впитаться в фильтрующий слой.

В колонку вносят 25 см^3 бензола, дают ему полностью пройти через фильтрующий слой, выходящий элюат отбрасывают. В колонку вносят 100 см^3 смеси бензола с этилацетатом (3 : 1). С этого момента начинают отбирать выходящий элюат. После прекращения выхода растворителя из колонки элюат переносят в остродонную колбу и выпаривают на ротационном испарителе при температуре не более 40 °С до объема около 0,5 см^3. Остаток растворителя удаляют в слабом токе азота при комнатной температуре. Сухой остаток в отгонной колбе растворяют в 0,2 см^3 смеси бензола с ацетонитрилом (объемное соотношение 9 : 1). Полученный раствор используют для хроматографического анализа.

5.4.4 Хроматографическое разделение

Пластинку для тонкослойной хроматографии на расстоянии 2 см от краев размечают тонкими карандашными линиями. В точку пересечения линий в правом нижнем углу наносят с помощью микрошприца 0,02 см^3 раствора пробы для хроматографического анализа по 5.4.3. В правом верхнем и левом нижнем углах на стартовых линиях отмечают по три точки, в которые микрошрицем наносят от 0,01 до 0,08 см^3 градуировочного раствора патулина так, чтобы масса патулина в пятнах варьировала в диапазоне от 10 до 80 нг. Пластинку одной из стартовых линий вниз помещают в камеру для тонкослойной хроматографии, предварительно заполненную смесью хлороформ-ацетон (объемное соотношение 4 : 1) на высоту около 1 см. Развитие хроматограммы проводят в первом направлении до достижения фронтом растворителя карандашной линии. Пластинку извлекают из камеры и выдерживают в вытяжном шкафу до исчезновения запаха растворителя. Высушенную пластинку помещают второй стартовой линией вниз в камеру для тонкослойной хроматографии, предварительно заполненную смесью толуол-этилацетат-муравьиная кислота (объемное соотношение 5 : 4 : 1) на высоту около 1 см. Проводят развитие хроматограммы во втором направлении до достижения фронтом растворителя карандашной линии. Пластинку извлекают из камеры и выдерживают в вытяжном шкафу до исчезновения запаха растворителя.

5.4.5 Обнаружение патулина

На вставку эксикатора ставят стеклянный стакан вместимостью 150 см^3 с 25 см^3 раствора марганцовокислого калия, рядом помещают хроматографическую пластинку. Эксикатор плотно закрывают крышкой и к раствору марганцовокислого калия по каплям приливают 25 см^3 соляной кислоты из капельной воронки, вставленной в отверстие крышки эксикатора. По истечении 15 мин пластинку извлекают из эксикатора, оставляют еще на 10 мин в вытяжном шкафу, а затем опрыскивают из распылителя раствором бензидина. Хроматографическую пластинку высушивают в токе холодного воздуха в вытяжном шкафу в течение 15–20 мин. Пластинку рассматривают в ультрафиолетовом свете. Патулин обнаруживается в виде желтых флуоресцирующих пятен. Обнаружение на пластинке пятна, соответствующего по цвету флуоресценции и хроматографической подвижности пятнам патулина из градуировочного раствора, свидетельствует о его наличии в анализируемой пробе. Путем визуального сопоставления определяют пятно патулина из градуировочного раствора, наиболее близкое по размеру и интенсивности флуоресценции пятну патулина из анализируемой пробы.

5.4.6 Проведение холостого испытания

Холостое испытание проводят для контроля пригодности реактивов для проведения испытания. Проводят процедуры по 5.4.1 – 5.4.5, используя в качестве пробы для анализа дистиллированную воду объемом 50 см^3. При обнаружении на хроматограмме пятна, близкого по хроматографической подвижности пятнам патулина в градуировочном растворе и способного либо давать ложноположительный результат, либо экранировать пятно патулина из анализируемого раствора пробы, находят реактивы, являющиеся источником такового загрязнения, и подвергают их дополнительной очистке, либо используют реактивы более высокой степени чистоты.

5.5 Обработка результатов

При взятии пробы для анализа по массе результат испытания представляют в виде массовой доли. Массовую долю патулина X_1, %, вычисляют по формуле

$$X_1 = \frac{m_1 \cdot V_1 \cdot V_3}{m \cdot V_2 \cdot V_4} \cdot 10^{-7}, \qquad (3)$$

где m_1 – масса патулина в пятне из градуировочного раствора, наиболее близком по размеру и интенсивности флюоресценции к пятну патулина из экстракта из пробы, нг;

m – масса пробы для анализа, г;

V_1 – общий объем водной вытяжки, приготовленной по 5.4.1, см^3;

V_2 – объем водной вытяжки, отобранный для проведения экстракции по 5.4.2, см^3;

V_3 – объем, до которого сконцентрирован элюат после колоночной очистки по 5.4.3, см^3;

V_4 – объем раствора пробы для хроматографического анализа, подготовленного по 5.4.3, нанесенный на пластинку, см^3.

При взятии пробы для анализа по объему результат испытания представляют в виде массовой концентрации. Массовую концентрацию патулина X_2, мг/дм^3, вычисляют по формуле

$$X_2 = \frac{m_1 \cdot V_1 \cdot V_3}{V_2 \cdot V_4 \cdot V_5} \cdot 10^{-3}, \qquad (4)$$

где m_1 – масса патулина в пятне из градуировочного раствора, наиболее близком по размеру и интенсивности флюоресценции к пятну патулина из экстракта из пробы, нг;

V_1 – общий объем водной вытяжки, приготовленной по 5.4.1, см^3;

V_2 – объем водной вытяжки, отобранный на анализ, см^3;

V_3 – объем, до которого сконцентрирован элюат после колоночной очистки по 5.4.3, см^3;

V_4 – объем раствора пробы для хроматографического анализа, подготовленного по 5.4.3, нанесенный на пластинку, см^3.

V_5 – объем пробы для анализа по 5.4.1, взятый для приготовления водной вытяжки см^3.

Результат испытания следует рассматривать как ориентировочное значение массовой концентрации или массовой доли патулина в пробе. Для более точного определения массовой концентрации или массовой доли патулина применяют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в соответствии с разделом 6.

6 Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

6.1 Сущность метода

Метод ВЭЖХ основан на экстракции патулина из исследуемой пробы этилацетатом, очистке экстракта перераспределением в водный раствор карбоната натрия, переэкстракции, концентрировании и количественном анализе экстракта с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) со спектрофотометрическим детектированием.

Диапазон измерений массовой концентрации патулина методом ВЭЖХ составляет от 10,0 мкг/дм^3 до 75,0 мкг/дм^3, массовой доли – от $10 \cdot 10^{-7}$ % до $75 \cdot 10^{-7}$ %. В интервале массовых концентраций от 1,0 до 10,0 мкг/дм^3 – концентрация патулина находится в следовых количествах.

Предел обнаружения патулина методом ВЭЖХ составляет 1 мкг/дм^3 или $1 \cdot 10^{-7}$ %.

6.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, посуда, реактивы, материалы

Хроматограф жидкостный в составе насоса высокого давления с диапазоном регулировки скорости потока подвижной фазы 0,1 – 5,0 см^3/мин, устройства дегазации подвижной фазы, устройства ввода пробы, спектрофотометрического детектора, пригодного для регистрации аналитического сигнала при длине волны 275 нм или спектрофотометрического детектора с диодной матрицей в рабочем диапазоне от 190 до 600 нм, компьютеризованной системой регистрации и обработки аналитического сигнала, обеспечивающий относительное среднеквадратическое отклонение при измерении площади пика не более 4 %, относительное среднеквадратическое отклонение при измерении времени удерживания не более 0,5 % и предел обнаружения по антрацену не более 0,01 мкг/см^3.

Колонка аналитическая длиной от 150 до 250 мм, внутренним диаметром от 3,0 до 4,6 мм, заполненная сорбентом на основе силикагеля, модифицированного фенильными группами[1)], частицами сферической формы диаметром 5 мкм, в комплекте с предколонкой, заполненной тем же сорбентом, обеспечивающая отделение пика патулина от остальных компонентов матрицы пробы.

Весы лабораторные среднего класса точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,01 г.

Посуда мерная лабораторная стеклянная по ГОСТ 1770:

цилиндры 1-50-2, 1-100-2 и 1-1000-2;

колбы мерные 4-50-2, 4-100-2, 4-250-2, 4-500-2 и 4-1000-2;

пробирки 1-10-0,1 ХС и 1-20-0,1 ХС;

Пипетки градуированные 1-2-2-1, 1-2-2-2, 1-2-2-5 и 1-2-2-10 по ГОСТ 29227.

Посуда лабораторная стеклянная по ГОСТ 25336:

стаканы В-1-50 и В-1-100;

воронки лабораторные В-56-80 ХС;

колба плоскодонная П-2-250;

колба грушевидная Гр-100-14/23;

колба остродонная О-25-14/23.

Центрифуга лабораторная с величиной фактора разделения (g-фактор) 800 – 1000 и с центрифужными коническими градуированными пробирками вместимостью 15 см^3 с завинчивающейся крышкой.

Фильтры мембранные с размером диаметра пор 0,45 мкм для фильтрования подвижной фазы и проб.

Пипетки автоматические переменного объема дозирования в диапазоне от 20 до 200 мм^3 с погрешностью дозирования не более ± 1 %, в комплекте с подходящими наконечниками (микропипетки).

Микрошприц вместимостью 250 мкл.

Емкости для жидких проб (виалы) вместимостью 2 см^3.

Вставки в виалы для микроколичеств вместимостью 300 мм^3.

Кислота уксусная ледяная по ГОСТ 19814, х.ч.

Натрий углекислый безводный, квалификации по ГОСТ 83, х.ч.

Калий фосфорнокислый однозамещенный (дигидрофосфат) (KH_2PO_4), ч.д.а.

Кислота ортофосфорная по ГОСТ 6552 (98 %), ч.д.а.

[1)] Сорбент марки Zorbax® Phenyl – апробирован и обеспечивают требуемую эффективность хроматографического разделения. Данная информация не является рекламой указанного сорбента и не исключает возможность применения других сорбентов, обеспечивающих аналогичное качество хроматографического разделения.

Иономер (pH-метр) с погрешностью измерения $\pm$ 0,01 ед. pH.

Испаритель ротационный вакуумный.

Насос водоструйный лабораторный по ГОСТ 25336.

Термометр жидкостный стеклянный по ГОСТ 28498 с пределом допускаемой погрешности ±2 °С в диапазоне измерений температур 0°С – 100 °С.

Колонка стеклянная хроматографическая длиной 230 мм и внутренним диаметром 15 мм.

Фильтры бумажные обеззоленные марки ФОМ по ГОСТ 12026.

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.

Патулин ($C_7H_6O_4$), стандартный образец состава раствора патулина в ацетонитриле аттестованным значением массовой концентрации 10,0 мкг/см^3 и относительной погрешностью аттестованного значения массовой концентрации не более ± 5 % .

Азот чистотой не менее 99 %, сжатый газ в баллоне, снабженном редуктором с гибким шлангом, на конце которого имеется стеклянный, пластиковый или металлический наконечник диаметром выходного отверстия 0,5 - 1 мм.

Бензол по ГОСТ 5956, ч.д.а., перегнанный.

Ацетонитрил для ВЭЖХ, ч., перегнанный.

Эфир этиловый уксусной кислоты (этилацетат) по ГОСТ 22300, ч.д.а., перегнанный.

Калий железистосинеродистый 3-водный по ГОСТ 4207, х.ч., раствор массовой концентрацией 150 г/дм^3 (раствор Карреза I).

Цинк уксуснокислый 2-водный по ГОСТ 5823, ч.д.а., раствор массовой концентрацией 300 г/дм^3 (раствор Карреза II).

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х.ч.

Натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4166, х.ч.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

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

6.3 Подготовка к испытанию

6.3.1 Приготовление экстрагирующего раствора.

Навеску безводного карбоната натрия массой от 0,6 до 0,8 г, взвешенной с точностью до 0,01 г, помещают в стакан вместимостью 50 см^3, растворяют в 30 см^3 воды, количественно переносят в мерную колбу на 50 см^3, доводят водой до метки и перемешивают.

Экстрагирующие растворы хранят в течение пяти дней при температуре 8 °С.

6.3.2 Приготовление раствора дигидрофосфата калия молярной концентрации 50 ммоль/дм^3 с pH = 3,0

Навеску 6,80 г дигидрофосфата калия взвешивают в стакане вместимостью 100 см^3, растворяют в 80 см^3 воды, количественно переносят в мерную колбу на 1000 см^3, доводят водой до метки и перемешивают. Раствор переносят в мерный стакан вместимостью 1000 см^3 и доводят pH до значения 3,0 ортофосфорной кислотой, регистрируя показания иономером. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Растворы дигидрофосфата калия хранят в течение пяти дней при температуре 8 °С.

6.3.3 Приготовление подвижной фазы

В качестве подвижной фазы используют смесь буферного раствора дигидрофосфата калия по 6.3.2 с ацетонитрилом в объемном соотношении 95:5. Компоненты подвижной фазы смешивают в цилиндре вместимостью 1000 см^3. Срок годности подвижной фазы – одна неделя.

6.3.4 Приготовление градуировочных растворов

6.3.4.1 Приготовление основного раствора патулина

Приготовление основного раствора с использованием кристаллического патулина проводят аналогично 5.3.1. В качестве растворителя для приготовления основного раствора вместо смеси бензола с ацетонитрилом используют ацетонитрил.

6.3.4.2 Приготовление градуировочных растворов с использованием основного раствора или аттестованных стандартных образцов состава раствора патулина

Аликвоту стандартного образца состава раствора патулина или основного раствора патулина по 6.3.4.1 разбавляют ацетонитрилом в соответствии с таблицей 1, при этом необходимые объемы стандартного образца и ацетонитрила отмеряют микропипеткой по 6.2.

Для градуировки хроматографа готовят не менее пяти градуировочных растворов в диапазоне массовой концентрации патулина от 1 до 7,5 мкг/см^3. .

Таблица 1

Наименование показателя	Номер градуировочного раствора патулина				
	1	2	3	4	5
Объем раствора стандартного образца раствора состава патулина или основного раствора патулина по 6.3.4.1, для приготовления градуировочного раствора, мм^3	75	50	30	20	10
Объем ацетонитрила, использованный для приготовления градуировочного раствора, мм^3	25	50	70	80	90
Массовая концентрация патулина в градуировочном растворе*, мкг/см^3	7,5	5	3	2	1

* Соответствует массовой концентрации патулина 10,0 мкг/см^3 в стандартном образце или в основном растворе патулина по 6.3.4.1.

При ином значении массовой концентрации патулина в стандартном образце или основного раствора патулина по 6.3.4.1 массовую концентрацию патулина в градуировочных растворов C, мкг/см^3 вычисляют по формуле

$$C = C_0 \frac{V_{c.o}}{V_{c.o} + V_{AN}} ,$$

где C_0 – аттестованное значение массовой концентрации патулина в стандартном образце или в основном растворе патулина по 6.3.4.1, мкг/см^3;

$V_{c.o}$– объем стандартного образца, использованный для приготовления градуировочного раствора, мм^3;

V_{AN} – объем ацетонитрила, использованный для разбавления стандартного образца при приготовлении градуировочного раствора, мм^3.

Градуировочные растворы патулина используют свежеприготовленными.

6.3.5 Условия хроматографического анализа

Температура колонки – (25 ± 5) °С.

Состав подвижной фазы – по 6.3.3.

Скорость протока подвижной фазы – 1,0 см^3/мин (ориентировочное значение).

Рабочая длина волны детектора – 275 нм.

Объем вводимой пробы – 10 мм^3.

Чувствительность шкалы регистрирующего устройства устанавливают таким образом, чтобы высота пика патулина при анализе градуировочного раствора по 6.3.4 максимальной концентрации находилась вблизи верхней границы диапазона регистрации аналитического сигнала.

Ориентировочное время удерживания патулина при использовании колонки длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм – 14 мин.

6.3.6 Градуировка хроматографа

Градуировку хроматографа выполняют в соответствии с руководством по эксплуатации оборудования и руководством пользователя программным обеспечением. При этом проводят хромато-

графический анализ градуировочных растворов по 6.3.4. Градуировочная характеристика признается приемлемой, если она установлена с коэффициентом корреляции не ниже 0,99.

Градуировку хроматографа проводят при смене оборудования, колонок, условий хроматографического анализа или при выявлении несоответствия градуировочной характеристики требованиям стабильности.

6.3.7 Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят ежедневно перед началом работы.

Проводят хроматографический анализ контрольного градуировочного раствора массовой концентрации патулина 3 мкг/см^3, приготовленный по 6.3.4, при этом регистрируют не менее двух хроматограмм. При помощи градуировочной зависимости рассчитывают массовую концентрацию патулина для каждой инжекции.

Проверяют сходимость результатов определения массовой концентрации патулина по формуле

$$|C_{к1} - C_{к2}| \le 0{,}05 \cdot \overline{C}_к, \qquad (5)$$

где $C_{к1}$ и $C_{к2}$ - массовые концентрации патулина, полученные по первой и второй хроматограммам соответственно, мкг/см^3;

$\overline{C}_к$ – среднеарифметическое значений $C_{к1}$ и $C_{к2}$, мкг/см^3.

При выполнении условия сходимости для дальнейших расчетов используют среднеарифметическое значение из двух результатов определения массовой концентрации патулина в контрольном градуировочном растворе.

Градуировочная зависимость признается стабильной, если выполняется условие

$$|\overline{C}_к - C| \le 0{,}10 \cdot C, \qquad (6)$$

где C – фактическая массовая концентрация патулина в контрольном градуировочном растворе, мкг/см^3.

6.3.8 Условия проведения испытания

Испытания проводят при следующих лабораторных условиях:
температура окружающего воздуха (25±5) ^{0}С;
атмосферное давление (97±10) кПа;
относительная влажность (65±15) %;
частота переменного тока (50±5) Гц;
напряжение в сети (220±10) В.

6.4 Проведение испытания

6.4.1 Приготовление раствора пробы для хроматографического анализа при испытании продуктов переработки плодов и овощей, за исключением фруктовых и овощных соков

Приготовление водной вытяжки из пробы для анализа, экстракцию и очистку экстракта проводят по 5.4.1 – 5.4.3 соответственно. Сухой остаток, полученный после удаления растворителя из очищенного экстракта по 5.4.3, растворяют в 200 мм^3 ацетонитрила, полученный раствор используют для хроматографического анализа.

6.4.2 Приготовление раствора пробы для хроматографического анализа при испытании фруктовых и овощных соков и сокосодержащих напитков, не содержащих нерастворимые в воде вещества

6.4.2.1 Экстракция

Пробу для анализа объемом 5,0 см^3, отмеренную пипеткой, помещают в делительную воронку, куда добавляют 5,0 см^3 этилацетата. Содержимое воронки интенсивно встряхивают в течение 0,5 мин, после разделения слоев отбирают верхний слой этилацетата. Экстракцию повторяют еще два раза новыми порциями этилацетата объемом по 5,0 см^3, экстракты объединяют.

6.4.2.2 Очистка экстракта

Объединенный экстракт помещают в делительную воронку, куда добавляют пипеткой 2,0 см^3 раствора карбоната натрия по 6.3.1. Содержимое воронки интенсивно встряхивают в течение 0,5 мин. После разделения слоев отделяют нижний водный слой и переносят его в другую делительную воронку, куда добавляют 5,0 см^3 этилацетата. Содержимое воронки интенсивно встряхивают в течение 0,5 мин, после разделения слоев отбирают верхний слой этилацетата и объединяют его с ранее полученным экстрактом.

К экстракту добавляют пять капель уксусной кислоты, смесь перемешивают и выпаривают на ротационном испарителе при температуре не выше 40 °С в остродонной колбе до объема около 0,5 см^3. Полученный таким образом раствор количественно переносят в виалу объемом 2 см^3 с помощью автоматической пипетки. Отгонную колбу ополаскивают двумя порциями этилацетата объемом около 0,2 см^3 каждая, смывы переносят в ту же виалу. Содержимое виалы выпаривают досуха в токе азота при комнатной температуре. Сухой остаток растворяют в 0,050 см^3 ацетонитрила, отмеренных автоматической пипеткой, и переносят во вставку для микроколичеств по 6.2. Полученный раствор используют для хроматографического анализа.

Важно: Очистку этилацетатного экстракта раствором карбоната натрия проводят как можно быстрее (не более 0,5 мин) из-за нестабильности патулина в щелочной среде.

6.4.3. Приготовление раствора пробы для хроматографического анализа при испытании фруктовых и овощных соков и сокосодержащих напитков с мякотью.

6.4.3.1 Экстракция

Пробу для анализа массой 5,00 г помещают в центрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой вместимостью 15 см^3. В пробирку добавляют порцию этилацетата объемом 5,0 см^3. Пробирку завинчивают крышкой и встряхивают в течение 1 мин., после чего пробу центрифугируют при центробежном ускорении не менее 990 g в течение 10 мин. Затем в стакан вместимостью 50 см^3 аккуратно сливают верхний слой, не затрагивая мякоть на границе разделения слоев. Экстракцию повторяют еще два раза, приливая каждый раз по 5 см^3 этилацетата с последующим центрифугированием. Этилацетатные фазы объединяют.

6.4.3.2 Очистка экстракта

Объединенный экстракт переносят в делительную воронку и проводят очистку по процедуре, описанной в 6.4.2.2.

6.4.4 Приготовление раствора пробы для хроматографического анализа при испытании концентрированных фруктовых и овощных соков

6.4.4.1 Концентрированные соки различных фруктов, ягод и овощей разбавляют дистиллированной водой в пять раз весовым методом. Для этого взвешивают ориентировочно 5 – 7 г концентрированного сока с точностью до второго десятичного знака и доводят дистиллированной водой массу раствора пробы до 25 – 35 г, взвешивая полученный раствор также с точностью до второго десятичного знака. Делением общей массы на массу навески концентрированного сока вычисляют коэффициент разбавления *K*, который учитывают при дальнейших вычислениях. Далее проводят все процедуры, описанные в 6.4.2 или 6.4.3, при этом пробу для анализа отбирают по массе.

6.4.5 Хроматографический анализ

Проводят хроматографический анализ раствора пробы, приготовленного по 6.4.1 – 6.4.4 при условиях по 6.3.5. Пик патулина идентифицируют по совпадению его времени удерживания со временем удерживания пика патулина на хроматограмме градуировочного раствора. С помощью градуировочной характеристики определяют массовую концентрацию патулина в растворе пробы для анализа. Если массовая концентрация патулина в растворе пробы для анализа превышает верхнюю границу диапазона градуировки, анализируемый раствор разбавляют ацетонитрилом и проводят его повторный анализ.

Примечание – Примеры хроматограмм патулина приведены на рисунках Б.1 – Б.4 приложения Б.

6.5 Обработка и оформление результатов определения

6.5.1 При приготовлении раствора пробы для анализа по 6.4.1 массовую долю патулина X_1, % вычисляют формуле

$$X_1 = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{m \cdot V_2} \cdot 10^{-4}, \qquad (7)$$

где C – массовая концентрация патулина в растворе пробы для анализа, определенная по 6.4.5, мкг/см^3;

V_1 – общий объем водной вытяжки, приготовленной по 5.4.1, см^3;

V_2 – объем водной вытяжки, взятый для экстракции по 5.4.2, см^3;

V_3 – объем, в котором сконцентрирован экстракт после очистки по 5.4.3, см^3;

m – масса пробы для анализа, г.

6.5.2 При приготовлении раствора пробы для анализа по 6.4.2 массовую концентрацию патулина X_2, мг/дм^3, вычисляют по формуле

$$X_2 = \frac{C\ V_2}{V_1}, \quad (8)$$

где C – массовая концентрация патулина в растворе пробы для анализа, определенная по 6.4.5, мкг/см^3;

V_1 – объем пробы для анализа по 6.4.2.1, см^3;

V_2 – объем, в котором сконцентрирован экстракт после очистки по 6.4.2.2, см^3.

6.5.3 При приготовлении раствора пробы для анализа по 6.4.3 массовую долю патулина X_3, %, вычисляют по формуле

$$X_2 = \frac{C\ V}{m} \cdot 10^{-4}, \quad (9)$$

где C – массовая концентрация патулина в растворе пробы для анализа, определенная по 6.4.5, мкг/см^3;

V_2 – объем, в котором сконцентрирован экстракт после очистки по 6.4.2.2, см^3;

m – масса пробы для анализа по 6.4.3.1, г.

6.5.4 При приготовлении раствора пробы для анализа по 6.4.4 массовую долю патулина X_4, %, вычисляют по формуле

$$X_4 = \frac{C\,V\,K}{m} 10^{-4}, \quad (10)$$

где С – массовая концентрация патулина в растворе пробы для анализа, определенная по 6.4.5, мкг/см^3;

V – объем, в котором сконцентрирован экстракт после очистки по 6.4.2.2, см^3;

K – коэффициент разбавления, рассчитанный по 6.4.4;

m – масса пробы для анализа, г.

Вычисления по формулам (7 – 10) проводят до третьей значащей цифры

За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, округленное до второй значащей цифры.

Расхождение между двумя параллельными определениями, выполненными в одной лаборатории в условиях повторяемости, не должно превышать предела повторяемости (сходимости) $r_{отн}$, приведенного в таблице 2, при вероятности P = 0,95.

Границы относительной погрешности определения массовой концентрации (массовой доли) патулина ±δ, при соблюдении условий, регламентированных настоящей методикой, при вероятности P = 0,95 не должны превышать значений, приведенных в таблице 2.

Т а б л и ц а 2 – Основные метрологические характеристики метода определения массовой концентрации или массовой доли микотоксина патулина

Наименование микотоксина	Диапазон измерения		Предел повторяемости, $r_{отн}$, %	Предел воспроизводимости, $R_{отн}$, %	Границы относительной погрешности, ±δ, %
	массовой концентрации, мкг/дм^3	массовой доли, %			
Патулин	10 – 75	$10 \cdot 10^{-7} – 75 \cdot 10^{-7}$	9	20	15

Окончательный результат определения массовой концентрации или массовой доли патулина представляют в виде

$$X_{ср} \pm \Delta, \quad (11)$$

где $X_{ср}$ – среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений массовой концентрации или массовой доли патулина, выполненных в условиях повторяемости, мкг/дм^3 (%);

Δ – границы абсолютной погрешности определений массовой концентрации или массовой доли патулина, мкг/дм^3 (%), рассчитывают по формуле

$$\Delta = \frac{\delta \cdot X_{ср}}{100}. \qquad (12)$$

Абсолютная погрешность измерений выражается числом, содержащим не более двух значащих цифр, при этом, численное значение результата измерений должно оканчиваться цифрой того же разряда, что и значение характеристики погрешности.

6.6 Контроль точности результатов определения

6.6.1 Контроль повторяемости (сходимости)

Контроль повторяемости (сходимости) результатов определений проводят при получении каждого результата определения путем сравнения расхождения между результатами двух параллельных определений, полученных в условиях повторяемости, с пределом повторяемости (сходимости), приведенным в таблице 2.

Повторяемость (сходимость) результатов определения признают удовлетворительной при условии:

$$|X_1 - X_2| \le 0{,}01 \cdot r_{отн} X_{ср}, \qquad (13)$$

При превышении предела повторяемости (сходимости) определение повторяют. При повторном превышении указанного предела выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и их устраняют.

6.6.2 Контроль погрешности (точности) результатов определений

Контроль погрешности (точности) результатов определений осуществляют методом добавок с использованием реальных проб продукции. Масса пробы должна соответствовать удвоенному количеству, необходимому для проведения определения. Пробу делят на две равные части. В одну из них микропипеткой добавляют основной раствор патулина по 6.3.4.1 или стандартный образец состава раствора патулина, в таких количествах, чтобы добавка составляла 50 % — 150 % исходного содержания компонента в пробе, но не превышала верхней границы диапазона определения массовой концентрации (массовой доли) компонента с учетом границ погрешности определения (таблица 2). Обе части пробы анализируют в точном соответствии с методом.

Результаты контрольных определений признают удовлетворительными, если погрешность определения массовых концентраций (массовых долей) патулина в добавке не превышает норматива контроля погрешности (точности), то есть выполняется условие

$$|X_{доб} - X_{ср} - c_{доб}| \le K_{доб}, \qquad (14)$$

где $X_{доб}$ – среднеарифметическое значение результатов двух определений пробы с добавкой, мкг/дм^3 (%);

$X_{ср}$ – среднеарифметическое значение результатов двух определений пробы без внесения добавки, мкг/дм^3 (%);

$c_{доб}$ – значение массовой концентрации (массовой доли) добавки, мкг/дм^3 (%);

$K_{доб}$ – норматив оперативного контроля погрешности, мкг/дм^3 (%).

При проведении внутрилабораторного контроля (P = 0,90) значение $K_{доб}$ вычисляют по формуле

$$K_{доб} = 0{,}84 \cdot \frac{\delta}{100} \cdot \sqrt{X_{доб}^2 + X_{ср}^2}. \qquad (15)$$

При проведении внешнего контроля (P = 0,95) значение $K_{доб}$ вычисляют по формуле

$$K_{доб} = \frac{\delta}{100} \cdot \sqrt{X_{доб}^2 + X_{ср}^2}, \qquad (16)$$

где δ – границы относительной погрешности определения массовой концентрации (массовой доли) патулина, указанной в таблице 2, %.

При превышении норматива оперативного контроля погрешности проводят повторные контрольные испытания. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

Периодичность контроля погрешности (точности) устанавливает сама лаборатория с учетом фактического состояния работ. При смене партий реактивов, экземпляров средств измерений проведение оперативного контроля погрешности обязательно.

7 Требования, обеспечивающие безопасность

7.1 Условия безопасного проведения работ

При работе с химическими реактивами следует соблюдать требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005 и ГОСТ 12.1.007. При подготовке проб к анализу и выполнении измерений с использованием жидкостного хроматографа соблюдают правила пожаровзрывобезопасности по ГОСТ 12.1.018, по электробезопасности – по ГОСТ 12.1.019 и по инструкции по эксплуатации прибора.

7.2 Требования к квалификации операторов

К выполнению испытаний и обработке результатов допускается инженер-химик, техник или лаборант, имеющий высшее или специальное образование, опыт работы в химической лаборатории и изучивший инструкцию по эксплуатации жидкостного хроматографа. Первое применение метода в лаборатории следует проводить под руководством специалиста, владеющего теорией высокоэффективной жидкостной хроматографии и имеющего практические навыки в этой области.

Приложение А
(обязательное)

Порядок градуировки спектрофотометра для определения патулина методом тонкослойной хроматографии

Для определения массовой концентрации патулина в градуировочном (основном) растворе готовят растворы двухромовокислого калия *с* ($K_2Cr_2O_7$) = 0,25 · 10^{-3} моль/дм^3, *с* ($K_2Cr_2O_7$) = 0,125 · 10^{-3} моль/дм^3, *с* ($K_2Cr_2O_7$)=0,625 · 10^{-3} моль/дм^3 в растворе серной кислоты *с* ($^1/_2$ H_2SO_4) = 0,018 моль/дм^3.

Раствор серной кислоты готовят следующим образом. В мерную колбу вместимостью 2000 см^3 пипеткой вносят 1 см^3 серной кислоты и доводят объем водой до метки. (Допускается использовать мерную колбу вместимостью 1000 см^3, соответственно уменьшив вдвое объем серной кислоты). Градуировочный раствор *с* ($K_2Cr_2O_7$) = 0,25 · 10^{-3} моль/дм^3 готовят следующим образом: 78 мг двухромовокислого калия вносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, растворяют в 100 – 200 см^3 раствора серной кислоты и доводят до метки раствором серной кислоты той же концентрации. Содержимое колбы тщательно перемешивают. Остальные калибровочные растворы готовят точным разведением первого раствора в два и в четыре раза раствором серной кислоты.

Определяют оптическую плотность каждого раствора в кювете с рабочей длиной 1 см на спектрофотометре при длине волны 350 нм. В качестве контрольного раствора используют раствор серной кислоты. По полученным значениям оптической плотности для каждого раствора вычисляют значение молярного показателя поглощения (*E*), дм^3·моль$^{-1}$·см$^{-1}$, по формуле

$$E = \frac{D}{c \cdot l}, \qquad \text{(А.1)}$$

где *D* – оптическая плотность калибровочного раствора;

с – молярная концентрация двухромовокислого калия в растворе, моль/дм^3;

l – рабочая длина кюветы, см.

По полученным значениям рассчитывают среднеарифметическое значение молярного показателя поглощения (*E*) и вычисляют поправочный коэффициент *(K_2)* для спектрофотометра по формуле

$$K_2 = \frac{E_c}{E}, \qquad \text{(А.2)}$$

где E_c – стандартизированное значение молярного показателя поглощения;

E_c = 3160 дм^3· моль$^{-1}$·см$^{-1}$.

Приложение Б
(справочное)

Примеры хроматограмм патулина

Б.1 Примеры хроматограмм патулина приведены на рисунках Б.1 – Б.4.

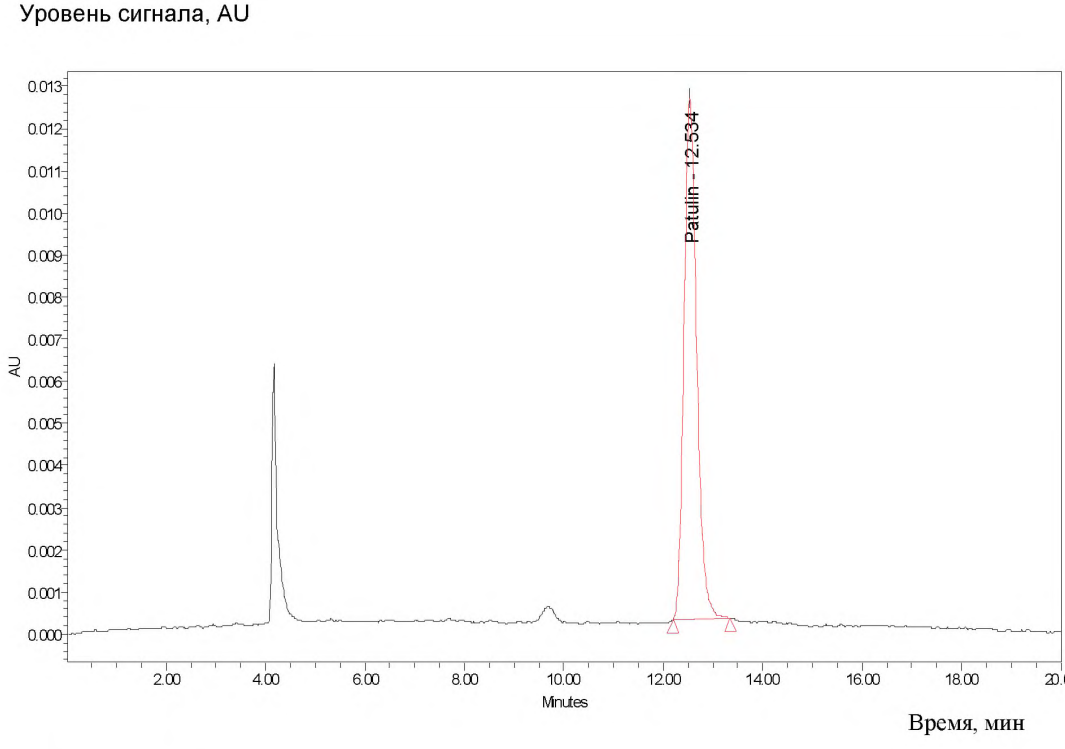


Рисунок Б.1 – Хроматограмма градуировочного раствора патулина (массовой концентрацией 2,86 мг/дм^3)

Уровень сигнала, AU

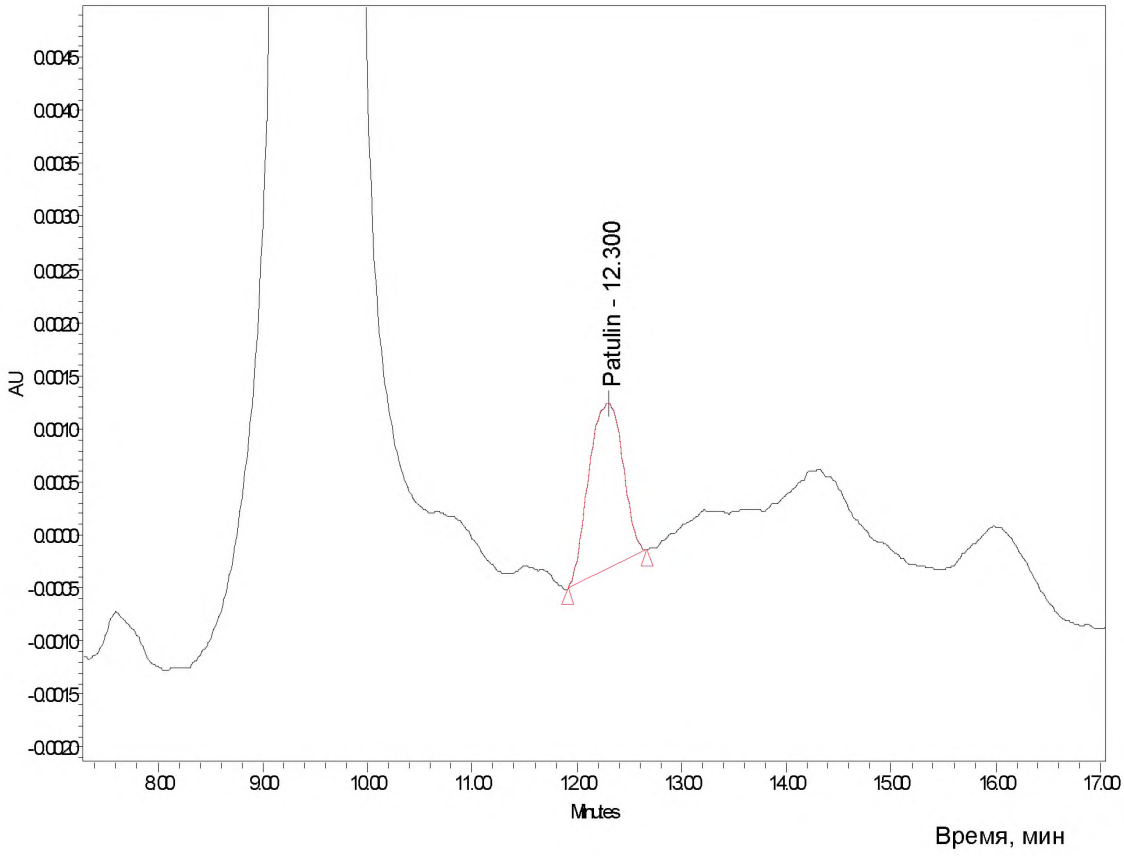
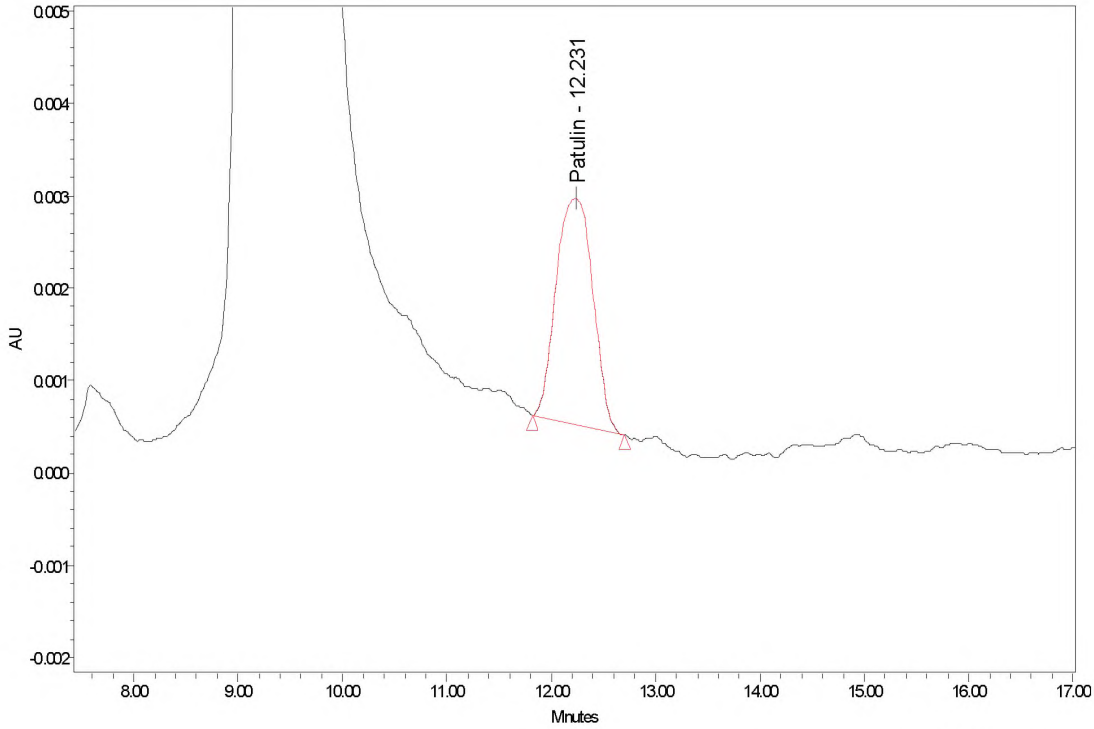


Рисунок Б.2 – Фрагмент хроматограммы концентрированного яблочного сока (массовой концентрацией патулина 23,3 мкг/дм^3)

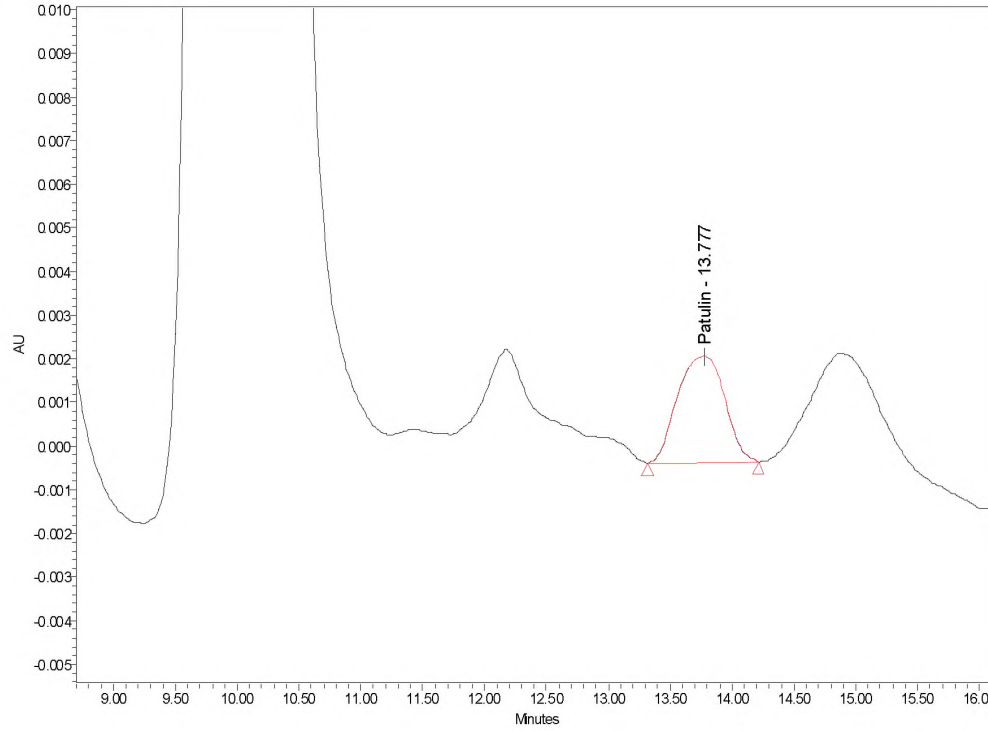
Уровень сигнала, AU



Время, мин

Рисунок Б.3 – Фрагмент хроматограммы концентрированного яблочного сока с добавкой раствора патулина 20,0 мкг/дм^3 (обнаруженная массовая концентрация патулина 39,2 мкг/дм^3)

Уровень сигнала, AU



Время, мин

Рисунок Б.4 – Фрагмент хроматограммы концентрированного томатного сока с добавкой раствора патулина массовой концентрацией 45,0 мкг/дм^3 (обнаруженная массовая концентрация патулина 42,6 мкг/дм^3)

УДК 664.863.001.4:006.354 МКС 67.050, 67.080

Ключевые слова: продукты переработки фруктов и овощей, соковая продукция, определение, фруктовые и овощные соки, нектары, морсы, патулин, метод тонкослойной хроматографии, высокоэффективная жидкостная хроматография, государственный стандартный образец, градуировочные растворы, массовая концентрация, массовая доля, подготовка к проведению измерения, проведение измерения, предел повторяемости, требования, обеспечивающие безопасность

Подписано в печать 01.04.2014. Формат 60x84 1/8.

Усл. печ. л. 2,79. Тираж 35 экз. Зак. 705.

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