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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 31748— 2012 (ISO 16050:2003)

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение афлатоксина B_1 и общего содержания афлатоксинов B_1, B_2, G_1 и G_2 в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

(ISO 16050:2003, MOD)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

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 ПОДГОТОВЛЕН ОАО «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО «ВНИИС»)

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

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 1 октября 2012 г. № 51)

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
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. № 1760-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 31748—2012 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2013 г.

5 Настоящий стандарт модифицирован по отношению к международному стандарту ISO 16050:2003 Foodstuffs — Determination of aflatoxin B_1, and the total content of aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2 in cereals, nuts and derived products — High-performance liquid chromatographic method (Продукты пищевые. Определение афлатоксина B_1 и общего содержания афлатоксинов B_1, B_2, G_1 и G_2 в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии). При этом дополнительные положения и требования, включенные в текст стандарта, выделены курсивом.

Международный стандарт разработан техническим комитетом по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO).

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий стандарт, и международных стандартов, на которых даны ссылки, имеются в национальных (государственных) органах по стандартизации указанных выше государств.

Степень соответствия — модифицированная (MOD).

Стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 53162—2008 (ИСО 16050:2003)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 *Сущность метода* 2
4 Реактивы 2
5 Оборудование 4
6 *Методика испытания* 5
7 *Обработка* результатов 6
8 Прецизионность 7
9 Протокол испытаний 8
Приложение А (*справочное*) Результаты межлабораторного сравнительного испытания 9
Библиография 11

Поправка к ГОСТ 31748—2012 (ISO 16050—2003) Продукты пищевые. Определение афлатоксина B_1 и общего содержания афлатоксинов B_1, B_2, G_1 и G_2 в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Раздел 2	*ГОСТ ISO 5725-1—2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения*	*ГОСТ ISO 5725-1—2003* Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения* * На территории РФ действует ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

(ИУС № 2 2015 г.)

Поправка к ГОСТ 31748—2012 (ISO 16050:2003) Продукты пищевые. Определение афлатоксина B1 и общего содержания афлатоксинов B1, B2, G1 и G2 в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

В каком месте	Напечатано	Должно быть
Предисловие. Пункт 3. Таблица согласования	—	Узбекистан | UZ | Узстандарт

(ИУС № 7 2015 г.)

Поправка к ГОСТ 31748—2012 (ISO 16050:2003) Продукты пищевые. Определение афлатоксина B_1 и общего содержания афлатоксинов B_1, B_2, G_1 и G_2 в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Армения	AM	Минэкономразвития Республики Армения

(ИУС № 6 2019 г.)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Определение афлатоксина B_1 и общего содержания афлатоксинов B_1, B_2, G_1 и G_2 в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

Foodstuffs. Determination of aflatoxin B_1, and the total content of aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2 in cereals, nuts and derived products. High-performance liquid chromatographic method

Дата введения — 2013—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой, с очисткой на иммуноафинной колонке и послеколоночной дериватизацией, для определения афлатоксинов в зерновых культурах, орехах и продуктах их переработки.

Предел количественного определения афлатоксина B_1 и суммы афлатоксинов B_1, B_2, G_1 и G_2 — 8 мкг/кг.

Данный метод применим в отношении кукурузы с содержанием 24,5 мкг/кг, арахисового масла с содержанием 8,4 мкг/кг и сырых арахисовых орехов с содержанием 16 мкг/кг общей суммы афлатоксинов.

Метод допускается использовать для масличных культур, сушеных фруктов и продуктов их переработки.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

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

ГОСТ 4159—79 Реактивы. Йод. Технические условия

ГОСТ 4204—77 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 5789—78 Реактивы. Толуол. Технические условия

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

ГОСТ 22524—77 Пикнометры стеклянные. Технические условия

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.

Издание официальное

3 *Сущность метода*

Анализируемый образец экстрагируют смесью метанола и воды. Экстракт образца фильтруют, разбавляют водой и вводят в колонку для аффинной хроматографии, содержащую антитела, специфичные для афлатоксинов B_1, B_2, G_1 и G_2. Афлатоксины выделяют, очищают и концентрируют на колонке, после чего отделяют от антител при помощи метанола. Афлатоксины определяют количественно при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с обращенной фазой с определением флуоресценции и послеколоночной дериватизацией.

4 Реактивы

При отсутствии специальных указаний используют реактивы только признанных аналитических марок квалификации х ч. или ч. д. а.

4.1 Вода, *не ниже 1-й* степени, по [*1*].

Вода не должна содержать органические примеси.

4.2 Хлорид натрия *по ГОСТ 4233.*

4.3 Йод кристаллический *по ГОСТ 4159.*

4.4 Афлатоксин, кристаллический или в виде пленочной ампулы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ! Афлатоксины канцерогенны для человека. Следует принимать во внимание заявление, сделанное Международным агентствами по исследованиям в области рака (ВОЗ) (см. [*2*], [*3*]).

Необходимо надлежащим образом предохранять лабораторию, в которой проводятся анализы, от дневного света. Для этого закрывают окна фольгой, поглощающей ультрафиолетовое излучение. Допускается использовать в комбинации с затемненным освещением (когда отсутствует прямое солнечное освещение) занавески или шторы в комбинации с искусственным освещением.

4.5 Ацетонитрил, степень чистоты для ВЭЖХ.

4.6 Метанол по *ГОСТ 6995, степень чистоты ВЭЖХ.*

4.7 Толуол по *ГОСТ 5789.*

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ! Толуол огнеопасен и токсичен. Приготовление стандартов с использованием данного растворителя следует проводить в вытяжном шкафу. Операции за пределами вытяжного шкафа, такие как измерение эталонов методом УФ спектрометрии, следует проводить с использованием эталонов в закрытых контейнерах.

4.8 Смесь толуол/ацетонитрил

Смешивают 98 объемных частей толуола (4.7) с двумя объемными частями ацетонитрила (4.5) (см. предупреждение в 4.7).

4.9 Растворитель для экстракции

Смешивают семь объемных частей метанола (4.6) с тремя объемными частями воды (4.1).

Другие смеси — растворители для экстракции, которые совместимы с подвижной фазой, могут также использоваться, если покажут себя более эффективными или будут рекомендованы производителем иммуноаффинной колонки.

4.10 Подвижная фаза

Смешивают три объемные части воды (4.1) с одной объемной частью ацетонитрила (4.5) и одной объемной частью метанола (4.6). Перед использованием проводят дегазацию раствора.

4.11 Реагент для послеколоночной дериватизации

Растворяют 100 мг йода (4.3) в 2 *см*^{3} метанола (4.6). Добавляют 200 *см*^{3} воды (4.1), перемешивают в течение 1 ч, фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (5.8). Раствор готовят на неделю использования и хранят в темноте или в склянке из коричневого стекла. Перед использованием раствор встряхивают в течение 10 мин.

4.12 Основные стандартные растворы афлатоксинов B_1, B_2, G_1 и G_2

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ! Растворы, содержащие афлатоксины, предохраняют от действия света (хранят в темноте, используют алюминиевую фольгу или затемненную стеклянную посуду).

Афлатоксины B_1, B_2, G_1 и G_2 растворяют по отдельности в смеси толуол/ацетонитрил (4.8), для получения индивидуальных растворов с массовой концентрацией вещества 10 мкг/см^3.

Для определения точной концентрации афлатоксина в каждом исходном растворе регистрируют спектр поглощения при длинах волн от 330 до 370 нм в кварцевых кюветах толщиной 1 см (5.7), используя спектрометр (5.6).

Рассчитывают концентрацию каждого афлатоксина ρ_i, мкг/*см*^{3}, используя уравнение (1):

$$\rho_i = \frac{A_{макс} \cdot M_i \cdot 1000}{\varepsilon_i \cdot d}, \quad (1)$$

где $A_{макс}$ — оптическая плотность, определяемая в максимуме спектра поглощения;

M_i — молекулярная масса каждого афлатоксина, г/моль;

ε_i — коэффициент молярного поглощения каждого афлатоксина в смеси толуол/ацетонитрил.

Примечание — Это значение определено для раствора, который содержит c = 1 моль/дм^3 афлатоксина и находится в кюветах с длиной оптического пути d = 1 см. Коэффициент молярного поглощения (ε) применяют без единиц измерения, допускается применять уравнение $A = \varepsilon \cdot c \cdot d$, ему соответствует единица измерений: дм$^3 \cdot$ моль$^{-1} \cdot$ см$^{-1}$;

d — длина оптического пути кюветы, см.

M_i и ε_i приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Молекулярные массы и коэффициенты молярного поглощения афлатоксинов B_1, B_2, G_1 и G_2

Афлатоксин	M_i, г/моль	ε_i
B_1	312	19300
B_2	314	20400
G_1	328	16600
G_2	330	17900
Примечание — В качестве растворителя используется смесь толуола и ацетонитрила (4.8).		

4.13 Основной стандартный раствор смеси афлатоксинов

Готовят исходный раствор, содержащий 500 нг/*см*^{3} афлатоксина B_1, 125 нг/*см*^{3} афлатоксина B_2, 250 нг/*см*^{3} афлатоксина G_1 и 125 нг/*см*^{3} афлатоксина G_2 в смеси толуол/ацетонитрил (4.8). При необходимости хранения раствора взвешивают колбу. Колбу плотно оборачивают алюминиевой фольгой и хранят при температуре около 4 °С. Непосредственно перед использованием колбу взвешивают снова и отмечают любые изменения в массе после хранения.

Примечание — Обычное воздействие УФ излучения во время измерения оптической плотности не приводит к заметной конверсии с образованием продуктов фотолиза.

4.14 Градуировочный раствор смеси афлатоксинов

Каждую порцию основного сандартного раствора смеси афлатоксинов (4.13), как это указано в таблице 2, переносят в четыре мерные колбы вместимостью 2 *см*^{3} (5.5). Растворы выпаривают до сухого остатка в токе азота при комнатной температуре. В каждую колбу добавляют 1 *см*^{3} метанола (4.6). Растворяют в нем сухой остаток, разбавляют раствор до метки водой (4.1) и перемешивают. Растворы готовят непосредственно в день использования.

Таблица 2 — Приготовление стандартных растворов

Стандартный раствор	Объем, отобранный из исходного раствора, мкл	Концентрация афлатоксина, нг/*см*^{3}			
		B_1	B_2	G_1	G_2
1	60	15,0	3,75	7,50	3,75
2	40	10,0	2,50	5,00	2,50
3	20	5,00	1,25	2,50	1,25
4	10	2,50	0,625	1,25	0,625
Примечание — Указанные значения приведены в качестве ориентиров. *Точные значения массовой концентрации растворов вычисляют исходя из значений, рассчитанных по формуле (1) — см. 4.12.*					

4.15 Серная кислота, по ГОСТ 4204, раствор $c(H_2SO_4)$ = 2 моль/*дм*^{3}.

5 Оборудование

Лабораторную стеклянную посуду, которая контактирует с водными растворами афлатоксинов в серной кислоте (4.15), погружают в воду на несколько часов, затем тщательно промывают (например, три раза) водой, чтобы удалить все следы кислоты. Отсутствие кислоты проверяют с помощью индикаторной бумаги.

Примечание — Данная обработка является необходимой, так как использование стеклянной посуды, промытой не кислотой, может привести к потере афлатоксинов. На практике данная обработка необходима для круглодонных колб, мерных колб, мерных цилиндров, склянок или пробирок, используемых для градуировочных растворов и конечных экстрактов (особенно автоматических пипеток), а также пастеровских пипеток, если они используются для переноса градуировочных растворов или экстрактов.

Обычное лабораторное оборудование и, в частности, то, которое приводится ниже.

5.1 Иммуноаффинная (IA) колонка

IA колонка содержит антитела, предназначенные для афлатоксинов B_1, B_2, G_1 и G_2. Колонка должна иметь минимальную емкость не менее 100 нг афлатоксина B_1 и должна давать выход не менее 80 % для афлатоксинов B_1, B_2 и G_1 и не менее 60 % для афлатоксина G_2 при внесении в колонку 15 *см*^{3} градуировочного раствора, содержащего 5 нг каждого афлатоксина в смеси метанол/вода [одна часть метанола (4.6) и три-четыре части воды (4.1) по объему]. Колонка должна быть оборудована подходящей емкостью для растворителя (например, шприцем с переходной насадкой).

5.2 Блендер, с баком смесителя на 500 см^3 и крышкой.

Рекомендуется использование высокоскоростного блендера.

5.3 Рифленая фильтровальная бумага, например, диаметром 24 см.

5.4 Фильтровальная бумага из стеклянного микроволокна, например, диаметром 11 см.

5.5 Мерные колбы *по ГОСТ 1770*, вместимостью 2 *см*^{3} *или пикнометры по ГОСТ 22524.*

Примечание — При использовании пикнометров рекомендуется измерять фактическое значение вместимости и использовать его при обработке результатов измерений в качестве величины V_5 [см. формулу (3)].

5.6 Спектрофотометр, *предназначенный для измерения оптической плотности в диапазоне* длин волн от 200 до 400 нм.

5.7 Кюветы из кварцевого стекла толщиной 1 см, не имеющие существенного поглощения в диапазоне длин волн от 300 до 370 нм.

5.8 Мембранный фильтр для водных растворов, изготовленный из политетрафторэтилена, диаметром 4 мм и размером пор 0,45 мкм.

5.9 Оборудование для ВЭЖХ

5.9.1 Насос ВЭЖХ, способный производить скорость потока 1 *см*^{3}/мин.

5.9.2 Система ввода (инжектор), со шприцевой загрузкой и петлей 50 мкл или эквивалентным.

5.9.3 Аналитическая разделяющая колонка с обращенной фазой, например C_{18}, которая обеспечивает разрешение пиков афлатоксинов B_1, B_2, G_1 и G_2 до базовой линии от всех остальных пиков и которая имеет следующие характеристики:

- длина: 250 мм;
- внутренний диаметр: 4,6 мм;
- размер сферических частиц: 5 мкм.

Допускается использование колонки меньшей длины.

5.9.4 Система послеколоночной дериватизации, состоящая из безпульсационного насоса и тройника, имеющего очень малый мертвый объем, системы труб из политетрафторэтилена или нержавеющей стали длиной от 3000 до 5000 мм и внутренним диаметром 0,5 мм, а также водяной бани или послеколоночного реактора для реакции с участием йода.

5.10 Флуоресцентный детектор, пригодный для работы при длине волны возбуждения 365 нм и излучении при длине волны эмиссии 435 нм (для фильтровых приборов длина волны регистрации излучения > 400 нм), *с пределом детектирования не более* 0,05 нг афлатоксина B_1 в объеме ввода (в данном случае он равен 50 мкл).

6 *Методика испытания*

6.1 Общие замечания

Растворы проб и стандартные растворы для определения с помощью ВЭЖХ должны содержать одинаковый растворитель или смесь растворителей.

6.2 Экстракция

Взвешивают 25 г гомогенизированной пробы, с точностью 0,1 г в сосуде блендера (см. 5.2). Добавляют 5 г хлорида натрия (см. 4.2) и 125 $см^3$ растворителя для экстракции (см. 4.10) и гомогенизируют с помощью перемешивающего устройства в течение 2 мин при высокой скорости. Контролируют, чтобы время и скорость перемешивания не оказывали негативного влияния на эффективность экстракции. Смесь фильтруют через рифленую фильтровальную бумагу (см. 5.3) (V_1).

Отбирают пипеткой 15 $см^3$ (V_2) фильтрата в коническую колбу подходящего размера со стеклянной пробкой. Добавляют 30 $см^3$ воды, закрывают колбу пробкой и перемешивают. Перед проведением аффинной колоночной хроматографии разбавленный экстракт фильтруют через фильтровальную бумагу из стеклянного микроволокна (5.4). Фильтрат (V_3) должен быть прозрачным. Если это не так, проводят повторную фильтрацию. Незамедлительно следуют процедурам в соответствии с 6.3.

Для получения прозрачного раствора можно также использовать центрифугу.

6.3 Очистка

Готовят IA колонку (см. 5.1) и осуществляют процедуру очистки в соответствии с инструкциями производителя. Отбирают пипеткой 15 $см^3$ (V_4) второго фильтрата (V_3) в емкость для растворителя IA колонки. Пропускают его через разделяющую колонку, затем промывают колонку, как это описано в инструкциях производителя и удаляют элюаты. Начинают проводить элюирование афлатоксинов. Собирают этанольный или ацетонитрильный элюат (в зависимости от продукта или инструкций производителя) в мерной колбе вместимостью 2 $см^3$ (см. 5.5) (или другого объема, установленного производителем). Разбавляют до метки водой (V_5). Перемешивают и действуют в соответствии с 6.4.

Методы ввода в IA колонки, промывания и элюирования немного отличаются в зависимости от производителя колонки, и необходимо четко следовать конкретным инструкциям, прилагаемым к колонкам.

Примечание — В целом, процедуры включают экстракцию образца смесью метанола и воды, фильтрацию или центрифугирование, возможное разбавление образца раствором фосфатного буфера или водой, загрузку под давлением в предварительно промытую колонку, промывку колонки дистиллированной водой и элюирование афлатоксинов метанолом или ацетонитрилом (в зависимости от продукта и инструкций производителя).

Допускается использовать традиционные колонки с силикагелем или колонки твердофазной экстракции. В этих случаях также необходимо четко следовать инструкциям производителя. Если растворитель, применяемый для элюирования афлатоксинов, не совместим с подвижной фазой, то элюат необходимо выпарить до сухого остатка в токе азота при температуре ниже 40 °С. Остаток необходимо растворить в подвижной фазе и разбавить до 2 $см^3$ или до того объема, который установлен производителем.

Необходимо предусмотреть, чтобы максимальная емкость колонки не была превышена.

6.4 Условия работы при выполнении ВЭЖХ

Выход разделительной колонки подсоединяют к одному ответвлению тройника системы послеколоночной дериватизации (5.9.4) с помощью короткого фрагмента системы труб с внутренним диаметром, например, 0,25 мм. Ко второму ответвлению тройника подсоединяют выход насоса, который поставляет реагент для послеколоночной дериватизации. Один конец витка труб из политетрафторэтилена или нержавеющей стали (см. 5.9.4) присоединяют к третьему ответвлению тройника и другой конец присоединяют к детектору (см. 5.10). Используя термостат или водяную баню, поддерживают температуру реакционного змеевика на уровне 70 °С.

В случае использования колонки, указанной в 5.9.3, подходящими являются следующие параметры:

- скорость потока подвижной фазы (колонка): 1,0 $см^3$/мин;
- скорость потока послеколоночного реагента: 0,3 $см^3$/мин;
- впрыскиваемый объем: 50 мкл.

Дают всей системе функционировать 10—20 мин для ее стабилизации. Если используется интегратор, настраивают регулировку чувствительности флуоресцентного детектора или интегратора, чтобы получить соответствующий сигнал: шум 5:1 для 0,125 нг афлатоксина G_2 в 50 мкл. Если используется

регистрирующий прибор с ленточной диаграммой, настраивают регулировку флуоресцентного детектора таким образом, чтобы получить для 0,125 нг афлатоксина G_2 в 50 мкл от 30 % до 40 % шкалы *регистрирующего прибора*.

6.5 Идентификация

Проводят идентификацию каждого пика афлатоксина на хроматограмме образца путем сравнения значений времени удерживания со значениями соответствующих стандартов.

Афлатоксины можно идентифицировать одновременным вводом раствора испытуемой пробы и градуировочных растворов. Кроме того, при идентификации помогает исчезновение пиков афлатоксинов B_1 и G_1 в случае, когда не проводится добавка реагента для дериватизации.

6.6 *Построение градуировочной зависимости*

Для каждого афлатоксина строят градуировочную зависимость путем ввода 50 мкл стандартных растворов 1, 2, 3 и 4 (см. таблицу 2). Проверяют линейность зависимости [*4*].

6.7 Определение

Количественное определение проводится методом внешнего стандарта с интегрированием площади пика или измерением высоты пика, которые далее соотносятся с соответствующими значениями для стандарта.

В петлю инжектора вводят 50 мкл стандартного раствора в соответствии с инструкциями производителя инжектора. Афлатоксины элюируют в порядке G_2, G_1, B_2 и B_1 с временем удерживания приблизительно 6, 8, 9 и 11 мин соответственно. Пики должны быть разделены до базовой линии. При необходимости регулируют значения времени удерживания путем изменения концентрации метанола подвижной фазы (4.11).

Вводят 50 мкл (V_6) очищенного экстракта образца (см. 6.3) в инжекторную петлю.

7 *Обработка* результатов

Рассчитывают массу m_t, г, анализируемой пробы, присутствующей во фракции второго фильтрата, взятого для IA колонки (V_4), по формуле

$$m_i = m_0 \frac{V_2 \cdot V_4}{V_1 \cdot V_3}, \qquad (2)$$

где m_0 — масса пробы образца (см. 6.2), г (m_0 = 25 г);

V_1 — общий объем первого фильтрата (см. 6.2), *см*^{3} (V_1 = 125 *см*^{3})[1)];

V_2 — объем фракции первого фильтрата (см. 6.2), взятый для разбавления, *см*^{3} (V_2 = 15 *см*^{3});

V_3 — общий объем второго фильтрата (см. 6.2), *см*^{3} (V_3 = 45 *см*^{3});

V_4 — объем фракции второго фильтрата (см. 6.3), *см*^{3} (V_4 = 15 *см*^{3}).

Рассчитывают массовую долю каждого афлатоксина, w_i, в микрограммах на килограмм пробы, вычисляют по формуле 3 (метод внешнего стандарта)

$$w_i = \frac{V_5 \cdot m_i}{V_6 \cdot m_t}, \qquad (3)$$

где V_5 — объем элюата (6.3), мкл (V_5 = 2000 мкл);

V_6 — объем очищенного и введенного экстракта образца (6.7), мкл (V_6 = 50 мкл);

m_i — масса *данного* афлатоксина, присутствующего в введенном объеме, соответствующая измеренной площади пика или высоте пика, определяемая по градуировочной характеристике, в нанограммах;

m_t — масса *анализируемой* пробы, г, соответствующей фракции второго фильтрата, взятого для IA колонки (V_4) (см. формулу (2)).

Для получения массовой доли суммы афлатоксинов суммируют массовые доли четырех афлатоксинов.

[1)] Принимая во внимание данные по точности метода, V_1 может рассматриваться как эквивалент объема растворителя экстракции.

8 Прецизионность

8.1 Межлабораторное сравнительное испытание

Детали межлабораторного сравнительного испытания прецизионности данного метода приведены в приложении А. Значения, полученные в результате межлабораторного сравнительного испытания, могут быть неприменимы к диапазонам концентраций и матрицам, отличных от тех, которые приведены в приложении А.

8.2 Повторяемость

Абсолютная разница между двумя независимыми отдельными результатами испытаний, полученными при использовании одного и того же метода, идентичных материалов для испытаний в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием того же оборудования в течение короткого интервала времени, будет превышать предел повторяемости *r*, значения которого приведены ниже, не более чем в 5 % случаев.

a) Значения для кукурузы:
- афлатоксин B_1: $\bar{x}$ = 14,9 мкг/кг, *r* = 2,4 мкг/кг,
- афлатоксин B_2: $\bar{x}$ = 1,4 мкг/кг, *r* = 1,0 мкг/кг,
- афлатоксин G_1: $\bar{x}$ = 7,2 мкг/кг, *r* = 1,9 мкг/кг,
- афлатоксин G_2: $\bar{x}$ = 1,0 мкг/кг, *r* = 0,6 мкг/кг,
- общее содержание афлатоксинов: $\bar{x}$ = 24,5 мкг/кг.

b) Значения для арахисового масла:
- афлатоксин B_1: $\bar{x}$ = 5,3 мкг/кг, *r* = 2,2 мкг/кг,
- афлатоксин B_2: $\bar{x}$ = 0,6 мкг/кг, *r* = 0,3 мкг/кг,
- афлатоксин G_1: $\bar{x}$ = 2,3 мкг/кг, *r* = 1,5 мкг/кг,
- афлатоксин G_2: $\bar{x}$ = 0,2 мкг/кг, *r* = 0,5 мкг/кг,
- общее содержание афлатоксинов: $\bar{x}$ = 8,4 мкг/кг.

c) Значения для арахиса:
- афлатоксин B_1: $\bar{x}$ = 9,7 мкг/кг, *r* = 1,5 мкг/кг,
- афлатоксин B_2: $\bar{x}$ = 1,1 мкг/кг, *r* = 0,7 мкг/кг,
- афлатоксин G_1: $\bar{x}$ = 4,5 мкг/кг, *r* = 0,8 мкг/кг,
- афлатоксин G_2: $\bar{x}$ = 0,6 мкг/к, *r* = 0,8 мкг/кг,
- общее содержание афлатоксинов: $\bar{x}$ = 16 мкг/кг.

Основываясь на полученных результатах, содержание афлатоксинов в арахисовом масле можно только оценить. В случае кукурузы и арахисовых орехов афлатоксины B_1 и G_1 могут быть определены, а афлатоксины B_2 и G_2 могут быть только обнаружены и их содержание может быть оценено качественно.

8.3 Воспроизводимость

Абсолютная разница между двумя отдельными результатами испытаний, полученными при использовании одинакового метода, идентичных материалов для испытаний в различных лабораториях различными операторами и с использованием различного оборудования, будет превышать предел воспроизводимости *R*, значения которого приводятся ниже, не более чем в 5 % случаев.

a) Значения для кукурузы:
- афлатоксин B_1: $\bar{x}$ = 14,9 мкг/кг, *R* = 4,2 мкг/кг,
- афлатоксин B_2: $\bar{x}$ = 1,4 мкг/кг, *R* = 1,2 мкг/кг,
- афлатоксин G_1: $\bar{x}$ = 7,2 мкг/кг, *R* = 1,9 мкг/кг,
- афлатоксин G_2: $\bar{x}$ = 1,0 мкг/кг, *R* = 1,5 мкг/кг,
- общее содержание афлатоксинов: $\bar{x}$ = 24,5 мкг/кг.

b) Значения для арахисового масла:
- афлатоксин B_1: $\bar{x}$ = 5,3 мкг/кг, *R* = 4,4 мкг/кг,
- афлатоксин B_2: $\bar{x}$ = 0,6 мкг/кг, *R* = 0,6 мкг/кг,
- афлатоксин G_1: $\bar{x}$ = 2,3 мкг/кг, *R* = 2,0 мкг/кг,
- афлатоксин G_2: $\bar{x}$ = 0,2 мкг/кг, *R* = 0,7 мкг/кг,
- общее содержание афлатоксинов: $\bar{x}$ = 8,4 мкг/кг.

c) Значения для арахиса:
- афлатоксин B_1: $\bar{x}$ = 9,7 мкг/кг, *R* = 4,5 мкг/кг,
- афлатоксин B_2: $\bar{x}$ = 1,1 мкг/кг, *R* = 1,2 мкг/кг,
- афлатоксин G_1: $\bar{x}$ = 4,5 мкг/кг, *R* = 1,8 мкг/кг,
- афлатоксин G_2: $\bar{x}$ = 0,6 мкг/кг, *R* = 1,4 мкг/кг,
- общее содержание афлатоксинов: $\bar{x}$ = 16 мкг/кг.

Основываясь на полученных результатах, содержание афлатоксинов в арахисовом масле можно только оценить качественно. В случае кукурузы и арахиса афлатоксины B_1 и G_1 могут быть определены, а афлатоксины B_2 и G_2 могут быть только обнаружены, и их содержание может быть оценено качественно.

9 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать:

- всю информацию, необходимую для полной идентификации образца;
- используемый метод отбора образцов, если он известен;
- используемый метод испытаний, со ссылкой на настоящий стандарт;
- детали проведения работ, не установленные в настоящем стандарте или рассматриваемые как необязательные, а также все факторы, влияющие на результат(ы) испытаний;
- полученные результат(ы) испытаний или, если была проведена проверка повторяемости, полученный окончательный результат.

Приложение А
(*справочное*)

Результаты межлабораторного сравнительного испытания

Нижеприведенные данные получены в процессе межлабораторного сравнительного испытания, которое проводилось в 1999 г. и было организовано АОАС и ИЮПАК (Международный союз теоретической и прикладной химии) в соответствии с ГОСТ ISO 5725-1. Были исследованы образцы кукурузы, арахисовых орехов и арахисового масла, имеющие естественное загрязнение и зафиксированные на уровне 10, 20 и 30 мкг/кг общей суммы афлатоксинов с соотношением афлатоксинов B_1, B_2, G_1, и G_2 — 7:1:3:1 соответственно.

В исследовании участвовало десять лабораторий, имелся один экземпляр каждого образца. Во время проведения данного межлабораторного сравнительного испытания в качестве реагента послеколоночной дериватизации использовался йод.

Т а б л и ц а А.1 — Данные по прецизионности и открываемости афлатоксина для кукурузы

Параметр	Афлатоксин				
	B_1	B_2	G_1	G_2	Сумма
Число лабораторий, оставшихся после исключения лабораторий с резко отличающимися результатами	9	9	9	10	9
Число принятых результатов	8	18	18	20	18
Среднее значение $\bar{x}$, мкг/кг	14,88	1,38	7,18	1,05	24,49
Стандартное отклонение сходимости s_r, мкг/кг	0,68	0,35	0,68	0,20	1,79
Коэффициент вариации сходимости, %	5,8	25	9,5	19	7,3
Предел сходимости r ($r = 2{,}8\ s_r$), мкг/кг	2,4	0,98	1,90	0,56	5,0
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/кг	1,50	0,41	0,68	0,53	2,86
Коэффициент вариации воспроизводимости, %	10	30	9,5	51	11,7
Предел воспроизводимости R ($R = 2{,}8\ s_R$), мкг/кг	4,20	1,15	1,90	1,48	8,01
Выход, %	85	55	96	42	81

Т а б л и ц а А.2 — Данные по прецизионности и открываемости афлатоксина для арахисового масла

Параметр	Афлатоксин				
	B_1	B_2	G_1	G_2	Сумма
Число лабораторий, оставшихся после исключения лабораторий с резко отличающимися результатами	10	9	10	10	10
Число принятых результатов	20	18	20	20	20
Среднее значение $\bar{x}$, мкг/кг	5,26	0,58	2,34	0,24	8,42
Стандартное отклонение сходимости s_r, мкг/кг	0,78	0,12	0,55	0,19	1,45
Коэффициент вариации сходимости, %	14,9	21	24	79	17
Предел сходимости r ($r = 2{,}8\ s_r$), мкг/кг	2,2	0,34	1,54	0,53	4,06
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/кг	1,56	0,22	0,71	0,24	2,54
Коэффициент вариации воспроизводимости, %	30	38	31	101	30
Предел воспроизводимости R ($R = 2{,}8\ s_R$), мкг/кг	4,37	0,62	1,99	0,67	7,11
Выход, %	90	70	93	29	84

Т а б л и ц а А.3 — Данные по прецизионности и открываемости афлатоксина для арахиса

Параметр	Афлатоксин				
	B_1	B_2	G_1	G_2	Сумма
Число лабораторий, оставшихся после исключения лабораторий с резко отличающимися результатами	9	10	10	10	9
Число принятых результатов	18	20	20	20	18
Среднее значение $\bar{x}$, мкг/кг	9,71	1,07	4,54	0,65	16
Стандартное отклонение сходимости s_r, мкг/кг	0,53	0,25	0,28	0,27	0,83
Коэффициент вариации сходимости, %	5,5	23	6,2	42	5,2
Предел сходимости r ($r = 2,8\ s_r$), мкг/кг	1,48	0,70	0,78	0,76	2,3
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/кг	1,62	0,41	0,66	0,50	2,58
Коэффициент вариации воспроизводимости, %	17	38	15	77	16
Предел воспроизводимости R ($R = 2,8\ s_R$), мкг/кг	4,54	1,15	1,85	1,4	7,22
Выход, %	83	64	91	39	80

Библиография

[1] ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use. Specification and test methods (ИСО 3696:1987 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний)

[2] Castegnaro M., Hunt D.C., Sansone E.B., Schuller P.L., Siriwardana M.G., Telling G.M., van Egmond H.P. и Walker E.A. Лабораторная очистка и разрушение афлатоксинов B_1, B_2, G_1 и G_2 в лабораторных отходах. Научная публикация IARC № 37, Международное агентство по исследованиям в области рака (ВОЗ), Лион (Франция), 1980 г., стр. 59

[3] Castegnaro M., Barek J., Fremy J.M., Lafontaine M., Miraglia M., Sansone E.B. и Telling G.M. Лабораторная очистка и разрушение канцерогенов в лабораторных отходах: некоторые микотоксины. Публикация IARC № 113, Международное агентство по исследованиям в области рака (ВОЗ), Лион (Франция), 1991 г., стр. 63

[4] Van Trijp J.M.P. и Roos A.H. Модель для расчета калибровочных кривых, доклад RIKILT, 91, 02, январь 1991 г.

УДК 637.544:006.354 МКС 67.060
67.080.10 MOD

Ключевые слова: пищевые продукты, афлатоксины B_1, B_2, G_1, G_2, зерновые культуры, арахис, арахисовое масло, кукуруза, высокоэффективная хроматография, иммуноафинная хроматография

Редактор *Н.В. Таланова*
Технический редактор *Е.В. Беспрозванная*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 27.08.2014. Подписано в печать 08.09.2014. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,30. Тираж 102 экз. Зак. 3682.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru