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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 31673— 2012 (ISO 6870:2002)

КОРМА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Определение содержания зеараленона

(ISO 6870:2002, MOD)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2013

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») на основе аутентичного перевода на русский язык международного стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 15 ноября 2012 г. № 42)

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
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Российская Федерация	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. № 1684-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 31673—2012 (ISO 6870:2002) введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2013 г.

5 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ISO 6870:2002 Animal feeding stuffs — Qualitative determination of zearalenone (Корма для животных. Качественный метод определения содержания зеараленона) путем изменения отдельных фраз и слов, что обусловлено потребностями межгосударственной экономики и особенностями межгосударственной стандартизации. Дополнительные и измененные слова, фразы, абзацы внесены в текст стандарта и выделены курсивом.

Международный стандарт разработан ТК 34, ПК 10.

Степень соответствия — модифицированная (MOD).

Стандарт подготовлен на основе применения ГОСТ Р 53097—2008

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта публикуется в ежемесячно издаваемом указателе «Национальные стандарты».

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты»

© Стандартинформ, 2013

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Сущность метода 1
4 Реактивы 2
5 Оборудование 3
6 Отбор проб 3
7 Методика испытания 3
8 Обработка результатов 5
9 Прецизионность 6
10 Протокол испытаний 6
Приложение А(справочное) Результаты межлабораторных испытаний 7
Библиография 7

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

КОРМА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Определение содержания зеараленона

Animal feeding stuffs. Determination of zearalenone

Дата введения — 2013—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает качественный метод определения зеараленона в кормах для животных, в частности, в кукурузе. Данный метод используется только для целей скрининга. Предел определения зеараленона *не более 50* мкг/кг.

Примечание — Несмотря на то, что сорго дает мешающие флуоресцирующие пятна, идентичные пятнам зеараленона, данный метод тем не менее применяется для данного корма, потому что значения R_f различны после проявления хроматограммы во втором направлении. Флуоресцирующие пятна не проявляются в случае использования установленного метода подтверждения.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 61—75 Реактивы. Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4197—74 Реактивы. Натрий азотистокислый. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9293—74 (ИСО 2435—73) Азот газообразный и жидкий. Технические условия (ISO 2435:1973 Азот для технических систем самолета, MOD)

ГОСТ 12433—83 Изооктаны эталонные. Технические условия

ГОСТ 20015—88 Хлороформ. 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 ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым 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 *Сущность* метода

Испытуемую пробу корма экстрагируют смесью ацетонитрила и раствором хлорида калия, затем фильтруют и обезжиривают изооктаном, после чего проводят очистку в смеси ацетонитрила, воды и ацетата свинца в присутствии диатомовой земли. После фильтрации пробу экстрагируют хлороформом, который затем выпаривают.

Издание официальное

Сухой экстракт растворяют в смеси бензола и ацетонитрила. Осуществляют двумерную тонкослойную хроматографию *испытуемой* пробы. Содержание зеараленона определяют визуальным измерением или измерением интенсивности флуоресценции пятна в УФ-свете путем сравнения с известными количествами зеараленона, нанесенными на ту же пластинку.

Идентичность зеараленона подтверждают с помощью *раствора* бис-диазотированного бензидина.

4 *Реактивы*

При испытании используют только реактивы аналитической чистоты и дистиллированную или деминерализованную воду либо воду эквивалентной чистоты по *ГОСТ 6709*.

4.1 Ацетонитрил ***для хроматографии.***

4.2 Изооктан по *ГОСТ 12433*.

4.3 Хлороформ *по ГОСТ 20015*.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ! Хлороформ — токсичное вещество. Необходимо избегать вдыхания или воздействия хлороформа. При работе с ним или его растворами необходимо использовать вытяжной шкаф.

4.4 Бензол/ацетонитрил, смесь 98:2, по объему.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ! Бензол токсичен при вдыхании и контакте с кожей, а также легко воспламеняется.

4.5 Элюенты

4.5.1 Толуол/этилацетат/муравьиная кислота, смесь 6:3:1, по объему.

4.5.2 Хлороформ/этанол, смесь 95:5, по объему.

4.6 Хлорид калия, раствор *массовой* концентрации *40* г/дм^3.

4.7 Раствор ацетата свинца, приготовленный следующим образом: 200 г ацетата свинца помещают в мерную колбу вместимостью 1000 *см^3* с одной меткой, добавляют 3 *см^3* уксусной кислоты по *ГОСТ 61*, доливают воду до метки и перемешивают.

4.8 Реагент бис-диазотированный бензидин

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ! Бензидин — канцероген и токсичен при вдыхании, контакте с кожей и попадании внутрь организма.

4.8.1 Приготовление раствора бензидина концентрацией 5 г/дм^3

0,5 г бензидина помещают в колбу вместимостью 100 см^3, содержащую 20 *см^3* воды и 1,5 *см^3* соляной кислоты *по ГОСТ 3118, добиваются растворения бензидина* и доливают воду до метки. Раствор хранят в темноте в склянках из коричневого стекла.

4.8.2 Приготовление *раствора бензидина*

Равные объемы раствора бензидина (см. 4.8.1) и раствора нитрита натрия *(натрий азотистокислый по ГОСТ 4197)* концентрацией 100 *г/дм^3* охлаждают до температуры от 0 °С до 5 °С.

Растворы тщательно смешивают. Полученный раствор становится темно-фиолетовым и мутнеет. Раствор оставляют, чтобы до использования он достиг комнатной температуры (желтого цвета).

Реагент готовят непосредственно перед использованием.

4.9 Диатомовая земля (Целит 545), промытая соляной кислотой.

4.10 Азот *газообразный по ГОСТ 9293*.

4.11 Зеараленон, стандартный раствор *массовой* концентрации 10 мкг/см^3, в бензоле.

Спектр поглощения раствора регистрируют между 300 и 330 нм на спектрометре при использовании кварцевых оптических кювет толщиной 10 мм относительно бензола. Фиксируют максимальную оптическую плотность А, которая наблюдается вблизи 317 нм.

Рассчитывают концентрацию зеараленона *К*, в микрограммах на миллилитр раствора, по формуле

$$K = \frac{318A \cdot 1000}{6060}, \quad (1)$$

где 318 — молярная масса зеараленона;

А — максимальная оптическая плотность;

6060 — молярный коэффициент поглощения.

5 Оборудование

Для испытаний используют следующее лабораторное оборудование:

5.1 Мельница, пригодная для приготовления продукта, который полностью просеивается через сито с размером отверстий 1 мм.

5.2 Аппарат для встряхивания (шейкер), способный производить около 100 встряхиваний в минуту.

5.3 Фильтровальная бумага с порами среднего размера *(«белая лента»)*.

Примечание — Фильтровальная бумага быстрой фильтрации (*«красная лента»*) даст мутный раствор; фильтровальная бумага медленной фильтрации (*«синяя лента»*) будет закупорена.

5.4 Роторный испаритель с круглодонной колбой.

5.5 Оборудование для тонкослойной хроматографии, нанесения пятен (капиллярные пипетки или микрошприцы), проявительная камера и оборудование для распыления реагента на пластинках.

5.6 Стеклянные пластинки для тонкослойной хроматографии с размерами 200 × 200 мм, которые готовят, как указано ниже (указанные количества достаточны для приготовления пяти пластинок).

30 г силикагеля G-HR взвешивают в конической колбе, добавляют 60 *см*^{3} воды, закрывают пробкой и тщательно перемешивают в течение 1 мин. Суспензию разливают по пластинкам таким образом, чтобы образовался равномерный слой толщиной 0,25 мм. Пластинкам дают высохнуть на воздухе и помещают их в эксикатор. Пластинки активируют перед использованием, помещая их на 1 ч в сушильный шкаф, в котором поддерживается температура (110 ± 3) °С.

Если получаемые результаты сопоставимы с результатами, получаемыми при использовании пластинок, приготовленных по методу, изложенному в предыдущем абзаце, можно использовать пластинки, которые имеются в продаже.

5.7 Коротковолновая УФ-лампа (длина волны 253 нм).

Интенсивность излучения должна быть такой, чтобы можно было четко различить пятно, содержащее 25 нг зеараленона на тонкослойной пластинке, когда лампа размещена на расстоянии 100 мм от пластинки.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ! В связи с опасностью УФ-излучения для глаз необходимо использовать средства защиты глаз.

5.8 Пробирки, *вместимостью* 10 см^3, с полиэтиленовыми пробками.

5.9 Флуороденситометр (его использование не обязательно, но желательно).

5.10 Водяная баня, поддерживающая температуру *(60 ± 1) °С*.

5.11 Коническая колба, *вместимостью* 500 см^3, с пришлифованной стеклянной пробкой.

5.12 Делительные воронки, *вместимостью* 250 см^3.

5.13 Мерные цилиндры, *вместимостью* 100 и 250 см^3.

5.14 Пипетки, *вместимостью* 50 и 100 см^3.

5.15 Микрошприцы.

6 *Отбор проб*

Лабораторную пробу продукции *отбирают* для испытаний в соответствии со стандартом, распространяющимся на данную продукцию, за исключением тех случаев, когда отбор образцов для определения зеараленона исключен из области его применения.

7 *Методика испытания*

7.1 Приготовление *пробы для испытаний*

Образец измельчают так, чтобы он полностью просеивался через сито с размером отверстий 1 мм. Тщательно перемешивают.

7.2 Испытуемая проба

50 г *образца для испытаний* взвешивают с точностью до 0,01 г в конической колбе вместимостью 500 *см*^{3}.

7.3 Экстракция

В коническую колбу с образцом добавляют 180 *см*^{3} ацетонитрила и 20 *см*^{3} раствора хлорида калия, тщательно отмеренных мерным цилиндром. Колбу закрывают пробкой, перемешивают и подвергают встряхиванию в шейкере в течение 30 мин.

Полученный раствор фильтруют через фильтровальную бумагу.

100 *см*^{3} фильтрата при помощи пипетки переносят в делительную воронку (см. 5.12) и обезжиривают, проводя две последовательные экстракции порциями по 50 *см*^{3} изооктана каждая.

Фазу ацетонитрила собирают в круглодонной колбе роторного испарителя и выпаривают при пониженном давлении до сухого остатка.

7.4 Очистка

К полученному остатку добавляют 20 *см*^{3} ацетонитрила, 60 *см*^{3} воды и 20 *см*^{3} раствора ацетата свинца, тщательно отмеренного мерным цилиндром. Перемешивают и выдерживают в течение 10 мин на водяной бане, температуру которой поддерживают на уровне 60 °С. Образуется осадок. Добавляют 5 г диатомовой земли и фильтруют через фильтровальную бумагу.

50 *см*^{3} фильтрата при помощи пипетки переносят в делительную воронку и проводят три последовательные экстракции, используя при каждой 50 *см*^{3} хлороформа. Хлороформные фракции высушивают при помощи сульфата натрия. Далее высушенные хлороформные фракции собирают в круглодонной колбе роторного испарителя и испаряют при пониженном давлении практически до сухого остатка.

Остаток количественно переносят в пробирку, промывая хлороформом, затем испаряют в атмосфере азота на водяной бане до сухого состояния.

Микрошприцом осторожно добавляют 0,5 *см*^{3} смеси бензол/ацетонитрил (см. 4.4) и плотно закрывают пробирку.

7.5 Двумерная тонкослойная хроматография

7.5.1 Нанесение растворов (см. рисунок 1)

На пластинке чертят две прямые линии, параллельные прилежащим сторонам (на расстоянии 50 и 60 мм, соответственно, от края), чтобы обозначить предел перемещения фронта растворителя. При помощи микрошприцев на пластинку наносят следующие растворы:

- в точку А — 25 мкл очищенного экстракта;
- в точку В — 10 мкл стандартного раствора;
- в точку С — 5 мкл стандартного раствора;
- в точку D — 10 мкл стандартного раствора;
- в точку Е — 15 мкл стандартного раствора.

Пластинки высушивают в потоке воздуха или азота. Диаметр образующихся пятен *не должен превышать 5 мм.*

7.5.2 Проявление *(элюирование)* (см. рисунок 1)

Проводят элюирование в направлении I, используя *элюент* (слой 10 мм в насыщенной камере, защищенной от света), пока фронт растворителя не достигнет обозначенной линии. Пластинку удаляют из *камеры* и дают ей высохнуть *в течение* 15 мин при комнатной температуре, предохраняя ее от действия света.

После *элюирования в направлении* I может быть полезным краткий просмотр хроматограммы под ультрафиолетовым излучением с длиной волны 253 нм и обозначение слегка карандашом контуров возможных пятен зеараленона (пятно в точке В показывает расположение зеараленона).

Далее проводят *элюирование* в направлении II, используя *элюент* (слой толщиной 10 мм в ненасыщенной *камере*, защищенной от света), пока фронт растворителя не достигнет обозначенной линии. Пластинку удаляют из *камеры* и дают ей высохнуть при комнатной температуре, предохраняя ее от действия света.

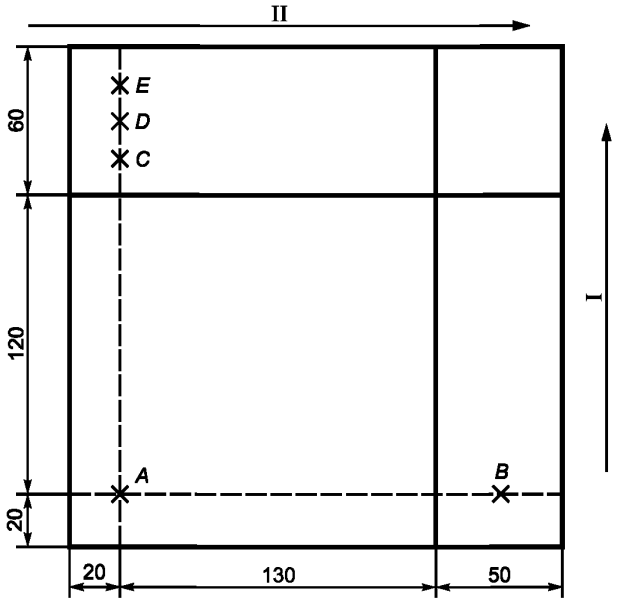


Рисунок 1 — Применение растворов и проявление хроматограммы

7.6 *Оценка содержания зеараленона*

7.6.1 Общие положения

Для определения присутствия зеараленона можно использовать два метода: визуальную *оценку интенсивности флуоресценции пятна* и флуороденситометрическое измерение. При наличии надлежащего оборудования последний метод является предпочтительным.

7.6.2 Визуальная *оценка*

Содержание зеараленона в образце определяют путем сравнения интенсивности флуоресценции под УФ-излучением пятна экстракта с интенсивностью *пятен* C, D и E стандартного раствора, при размещении пластинки на расстоянии 10 см от УФ-лампы. При необходимости проводят интерполяцию.

Если интенсивность флуоресценции 25 мкл экстракта больше, чем 15 мкл стандартного раствора, используют меньший объем *раствора* в точке A или разбавляют экстракт смесью бензол/ацетонитрил и проводят повторную тонкослойную хроматографию.

7.6.3 Флуороденситометрическое измерение

Интенсивность флуоресценции пятен измеряют с помощью флуороденситометра при длине волны возбуждения 313 нм и длине волны излучения 443 нм (максимальное излучение при 470 нм).

Содержание зеараленона в образце определяют путем сравнения интенсивности флуоресценции пятна экстракта с интенсивностями пятен C, D и E стандартного раствора.

7.7 Испытание на подтверждение наличия зеараленона

На пластинку распыляют реагент бис-диазотированный бензидин. Зеараленон образует яркое кирпично-красное пятно при комнатной температуре, которое исчезает при выдержке на воздухе в течение 15 мин.

8 Обработка результатов

8.1 Визуальное измерение

Содержание зеараленона B, выраженное в микрограммах на килограмм продукции, рассчитывают по формуле

$$B = \frac{c \cdot V_1 \cdot V_3}{m \cdot V_2}, \qquad (2)$$

где c — *массовая* концентрация зеараленона, в микрограммах на миллилитр стандартного раствора;

m — масса испытуемой пробы, соответствующей объему экстракта, который проходит очистку (12,5 г), г;

V_1 — конечный объем экстракта *с учетом возможных разбавлений*, в микролитрах;

V_2 и V_3 — объемы экстракта и стандартного раствора зеараленона соответственно, наносимые на пластинку, которые показывают аналогичную интенсивность флуоресценции, в микролитрах.

8.2 Флуороденситометрическое измерение

Содержание зеараленона B_1, выраженное в микрограммах на килограмм продукции, рассчитывают по формуле

$$B_1 = \frac{m_1 \cdot V_1}{m \cdot V_2}, \quad (3)$$

где m — масса испытуемой пробы, соответствующей объему экстракта, который проходит очистку (12,5 г), г;

m_1 — масса зеараленона в пятне экстракта (принимая во внимание объем V_2), установленная на основе определений, в нанограммах;

V_1 — конечный объем экстракта, в микролитрах;

V_2 — объем экстракта, наносимого на пластинку, в микролитрах.

9 Прецизионность

Подробности межлабораторных испытаний *прецизионности* данного метода приведены в приложении А. Значения, полученные на основе межлабораторных испытаний, могут быть неприменимы к диапазонам концентраций и матрицам, отличным от тех, которые приведены.

10 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен содержать:

- информацию, необходимую для полной идентификации *пробы*;
- применяемый метод отбора проб, если он известен;
- *используемый метод испытаний* со ссылкой на данный стандарт;
- используемый метод определения (визуальный или флуороденситометрический);
- подробные данные проведения работ, не установленные в данном стандарте или рассматриваемые как необязательные, а также все факторы, влияющие на результат(ы) испытаний;
- полученный результат(ы) испытаний.

Приложение А
(справочное)

Результаты межлабораторных испытаний

Международное межлабораторное испытание с участием 20 лабораторий (только 16 из которых предоставили пригодные результаты для кукурузы В), каждая из которых провела три определения, дает следующие статистические результаты (оцененные в соответствии с [1]), приведенные в таблице А.1.

Таблица А.1 — Результаты межлабораторного испытания

Образец	Кукуруза А	Кукуруза В (кукуруза А, разбавленная на 1/3 кукурузой без зеараленона)
Количество лабораторий, оставшихся после исключения выбросов	20	15
Среднее значение, мкг/кг	734	219
Стандартное отклонение повторяемости s_r мкг/кг Коэффициент вариации повторяемости, % Предел повторяемости r (2,83 s_r), мкг/кг	78 11 221	34 15 96
Стандартное отклонение воспроизводимости s_R, мкг/кг Коэффициент вариации воспроизводимости, % Предел воспроизводимости R (2,83 s_R), мкг/кг	282 38 798	125 57 354

Библиография

[1] ISO 5725-4:2002 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 4. Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method
[Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерения. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерений]

УДК 637.544:006.354 МКС 65.120 С19 MOD

Ключевые слова: корма для животных, зеараленон, зерновые культуры, метод испытания, тонкослойная хроматография, УФ-излучение, элюирование, флуороденситометрическое измерение

Редактор *Н.В. Таланова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *Ю.М. Прокофьева*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 18.04.2013. Подписано в печать 14.06.2013. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,07. Тираж 121 экз. Зак. 499.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru