ГОСТ Р 51425—99
(ИСО 6870—85)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ

Метод определения массовой доли зеараленона

Издание официальное

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Творческим коллективом с участием представителей Технического комитета по стандартизации ТК 4 «Комбикорма, белково-витаминные добавки, премиксы»

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 4 «Комбикорма, белково-витаминные добавки, премиксы»

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 22 декабря 1999 г. № 580-ст

3 Настоящий стандарт представляет собой аутентичный текст международного стандарта ИСО 6870—85 «Корма для животных. Определение содержания зеараленона», за исключением разделов 3, 6

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

5 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Сентябрь 2005 г.

© ИПК Издательство стандартов, 2000
© Стандартинформ, 2005

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

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ

Метод определения массовой доли зеараленона

Feedstuffs, compound feeds, feed raw materials.
Method for determination of zearalenone fraction of total mass

Дата введения 2001—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на корма, комбикорма, комбикормовое сырье и устанавливает метод определения массовой доли зеараленона.

Предел обнаружения зеараленона составляет около 50 мкг/кг.

2 Сущность метода

Анализируемое вещество экстрагируют из навески испытуемого продукта смесью ацетонитрила и раствора хлористого калия, фильтруют, берут аликвоту и обезжиривают ее изооктаном с последующей очисткой смесью ацетонитрила, воды, ацетата свинца и диатомовой земли; после фильтрования экстрагируют аликвотное количество хлороформом, который впоследствии испаряется.

Растворяют сухой экстракт смесью бензола и ацетонитрила, аликвотную порцию этого раствора подвергают двухмерной тонкослойной хроматографии. Содержание зеараленона определяют визуально или путем измерения интенсивности флуоресценции пятна в ультрафиолетовом излучении и сравнения с известными количествами зеараленона, нанесенными на ту же пластину, что и экстракт испытуемой пробы.

Подтверждение идентичности зеараленона проводят с помощью бисдиазотированного бензидина.

3 Нормативные ссылки

ГОСТ 13496.0—80* Комбикорма, сырье. Методы отбора проб

4 Реактивы

Все реактивы должны быть квалификации х. ч. или ч. д. а:
вода дистиллированная;
ацетонитрил;
изооктан;
хлороформ;
смесь бензола и ацетонитрила в объемном соотношении 98 : 2;
Предупреждение — Бензол токсичен при вдыхании и контакте с кожей. Огнеопасен.

---

* Действует до введения в действие ГОСТ Р, разработанного на основе ИСО 6497 [1].

проявляющие растворители (смесь толуола, этилацетата и муравьиной кислоты в объемном соотношении 6 : 3 : 1 и смесь хлороформа и этанола в объемном соотношении 95 : 5);

раствор хлористого калия массовой концентрации 40 г/дм^3;

раствор уксуснокислого свинца готовят следующим образом:

200 г уксуснокислого свинца помещают в мерную колбу с одной отметкой вместимостью 1000 см^3, добавляют 3 см^3 уксусной кислоты, доводят водой до метки и перемешивают;

бисдиазотированный бензидиновый реактив.

Приготовление раствора бензидина массовой концентрации 5 г/дм^3.

В мерную колбу вместимостью 100 см^3 приливают 20 см^3 воды, 1,5 см^3 соляной кислоты и вносят 0,5 г бензидина, доводят водой до метки и перемешивают.

Раствор следует хранить в защищенном от света месте в склянке из темного стекла.

Приготовление реактива

Равные объемы растворов бензидина и нитрита натрия массовой концентрации 100 г/дм^3 охлаждают примерно до температуры от 0 до минус 5 °С, тщательно перемешивают. Полученный раствор мутный и имеет темно-пурпурный цвет. Перед использованием его доводят до температуры окружающей среды, раствор приобретает желтый цвет.

Реактив готовят непосредственно перед использованием;

Предупреждение — Бензидин является канцерогенным веществом. Токсичен при вдыхании, контакте с кожей, приеме внутрь.

диатомовая земля (цеолит 545), промытая соляной кислотой;

азот;

зеараленон, стандартный раствор в бензоле массовой концентрации 10 мкг/см^3.

На спектрометре определяют спектр поглощения раствора в диапазоне длин волн 300 и 330 нм, используя кювету толщиной просвечиваемого слоя 10 мм относительно бензола; регистрируют максимальное поглощение A, которое должно составлять примерно 317 нм.

Массовую концентрацию зеараленона c, мкг/см^3, рассчитывают по формуле

$$c = \frac{318\,A\,1000}{6060}, \qquad (1)$$

где 318 — молярная масса зеараленона, г/моль;

6060 — коэффициент молярной экстинкции, дм^3/моль · см.

5 Оборудование и материалы

Для проведения испытания применяют обычное лабораторное оборудование:

мельницу для измельчения продукта до такой степени, чтобы он полностью проходил через сито, диаметр отверстий которого равен 1 мм;

встряхиватель со скоростью встряхивания 100 колебаний в минуту;

бумагу фильтровальную средней плотности (рыхлая фильтровальная бумага дает мутный раствор, плотная фильтровальная бумага будет забиваться);

испаритель ротационный с круглодонной колбой;

оборудование для тонкослойной хроматографии, т. е. оборудование для подготовки пластин и нанесения пятен (капиллярные пипетки или микрошприцы), емкость для проявления и распылитель для напыления реактива на пластины (пульверизатор);

пластины стеклянные для тонкослойной хроматографии размером 200 × 200 мм подготавливают следующим образом: 30 г силикагеля *G-HR* помещают в коническую колбу, приливают 60 см^3 воды, закрывают и тщательно перемешивают в течение 1 мин. Полученную суспензию наносят на пластины таким образом, чтобы получить равномерный слой толщиной 0,25 мм. Высушивают слой на воздухе и хранят пластины в эксикаторе. Перед использованием пластины активируют, выдерживая их в печи при температуре 110 °С в течение 1 ч.

Указанного количества суспензии силикагеля достаточно для подготовки 5 пластин.

Допускается использовать пластины промышленного применения, если результаты, полученные с их применением, будут сравнимы с результатами, полученными на пластинах, подготовленных по вышеописанному способу;

лампы ультрафиолетовые с короткой длиной волны (253 нм).

Интенсивность излучения должна обеспечивать четкую видимость пятна в 25 нг зеараленона на тонкослойной пластине при установке лампы на расстоянии 100 мм от пластины;

Предупреждение — При работе с ультрафиолетовыми лучами в целях безопасности следует надевать защитные очки.

пробирки с полиэтиленовой пробкой вместимостью 10 $см^3$;

флуороденситометр (при наличии);

баню водяную температурой 60 °С;

колбы конические с притертой пробкой вместимостью 500 $см^3$;

воронки делительные вместимостью 250 $см^3$;

цилиндры мерные вместимостью 100 и 250 $см^3$;

пипетки вместимостью 50 и 100 $см^3$;

микрошприцы.

6 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ 13496.0.

7 Порядок проведения испытания

7.1 Подготовка испытуемой пробы

Пробу, предназначенную для испытания, измельчают так, чтобы она полностью проходила через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Тщательно перемешивают.

7.2 Взятие навески для проведения испытаний

50 г испытуемой пробы взвешивают в конической колбе с точностью 0,01 г.

7.3 Экстрагирование

В колбу с навеской приливают 180 $см^3$ ацетонитрила и 20 $см^3$ раствора хлористого калия, тщательно отмеренные мерным цилиндром. Закрывают колбу, перемешивают и устанавливают на встряхиватель на 30 мин. Затем содержимое колбы фильтруют через фильтровальную бумагу.

100 $см^3$ фильтрата переливают пипеткой в делительную воронку, где фильтрат двукратно обезжиривают изооктаном по 50 $см^3$ каждый раз.

Ацетонитриловую фазу переносят в круглодонную колбу ротационного испарителя и высушивают досуха при пониженном давлении.

7.4 Очистка

К полученному остатку приливают 20 $см^3$ ацетонитрила, 60 $см^3$ воды и 20 $см^3$ раствора уксуснокислого свинца, тщательно отмеренных мерным цилиндром. Перемешивают и ставят в водяную баню на 10 мин при температуре 60 °С для образования осадка. Затем добавляют 5 г диатомовой земли, перемешивают и фильтруют через фильтровальную бумагу.

50 $см^3$ фильтрата отбирают пипеткой в делительную воронку и проводят тройную переэкстракцию хлороформом по 50 $см^3$ каждый раз. Хлороформную фракцию высушивают над сульфатом натрия. Собирают фракции хлороформа в круглодонную колбу ротационного испарителя и высушивают досуха при пониженном давлении.

Сухой остаток растворяют в хлороформе и количественно переносят в пробирку, затем высушивают досуха в токе азота на водяной бане.

При помощи микрошприца осторожно добавляют в пробирку 0,5 $см^3$ бензол-ацетонитриловой смеси и пробирку плотно закрывают пробкой.

7.5 Проведение двухмерной тонкослойной хроматографии

7.5.1 Нанесение растворов (рисунок 1)

На пластине проводят две прямые линии, параллельные прилегающим сторонам (на расстоянии от краев на 50 и 60 мм соответственно), с целью отметки границы перемещения растворителей.

С помощью микрошприцев на пластину наносят растворы в точках по схеме, указанной на рисунке 1.

- *A* — 25 $мкдм^3$ очищенного экстракта.
- *B* — 10 $мкдм^3$ стандартного раствора.
- *C* — 5 $мкдм^3$ стандартного раствора.
- *D* — 10 $мкдм^3$ стандартного раствора.
- *E* — 15 $мкдм^3$ стандартного раствора.

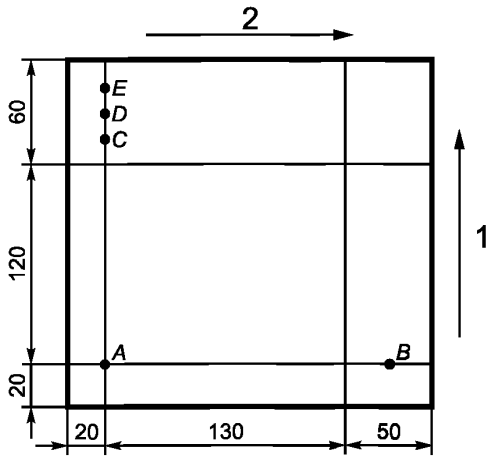


Рисунок 1 — Нанесение растворов и проявление хроматограммы

Высушивают пластину струей воздуха или азотом.

Полученные пятна должны быть диаметром около 5 мм.

7.5.2 Проявление (рисунок 1)

Проявляют хроматограмму в направлении 1, используя смесь толуола, этилацетата и муравьиной кислоты в объемном соотношении 6 : 3 : 1 слоем в 10 мм в насыщенной камере для хроматографирования, защищенной от воздействия света, до тех пор, пока фронт растворителя не достигнет линии отметки. Вынимают пластину из камеры и дают подсохнуть около 15 мин при температуре окружающей среды в защищенном от света месте.

Примечание — После проявления в направлении *1* хроматограмму просматривают в ультрафиолетовом свете с длиной волны 253 нм, и возможные пятна зеараленона отмечают карандашом (пятно в точке *B* свидетельствует о наличии зеараленона).

Далее проводят хроматографирование в направлении 2, используя для этой цели смесь хлороформа и этанола в объемном соотношении 95 : 5 слоем 10 мм в ненасыщенной камере в защищенном от света месте, пока фронт растворителя не достигнет линии отметки. Вынимают пластину из камеры и подсушивают ее при температуре окружающей среды в защищенном от света месте.

7.6 Определение

Для определения используют два способа: визуальный или флуороденситометрическое измерение. Последний способ используют при наличии аппарата.

7.6.1 Визуальное определение

Определяют количество зеараленона в экстракте путем сравнения интенсивности флуоресценции в ультрафиолетовом свете пятна экстракта испытуемой пробы с интенсивностью свечения пятен *C, D* и *E* стандартного раствора, поместив пластину на расстоянии 10 см от ультрафиолетовой лампы. При необходимости осуществляют интерполирование полученных данных.

Если интенсивность флуоресценции пятна экстракта испытуемой пробы объемом 25 мкдм^3 превышает интенсивность свечения пятна стандартного раствора зеараленона объемом 15 мкдм^3, то наносят меньший объем экстракта в точку *A* или разбавляют экстракт смесью бензола с ацетонитрилом и повторяют тонкослойное хроматографирование, начиная с 7.5.

7.6.2 Флуороденситометрическое определение

Измеряют интенсивность флуоресценции пятен флуороденситометром, например на волне возбуждения в 313 нм и волне эмиссии в 443 нм (максимальная эмиссия при 470 нм).

Определяют содержание зеараленона в экстракте, нанесенном на пластину, путем сравнения интенсивности флуоресценции пятна экстракта с интенсивностью свечения пятен *C, D* и *E* стандартного раствора.

7.7 Проверочное испытание на присутствие зеараленона

Напыляют на пластину, подготовленную по 7.5 бисдиазотированный бензидин. Зеараленон дает яркое кирпично-красное пятно при температуре окружающей среды, выцветающее после 15-минутной экспозиции на воздухе.

8 Обработка результатов

8.1 Визуальное определение

Содержание зеараленона *X*, мкг/кг, рассчитывают по формуле

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

где c — массовая концентрация зеараленона в стандартном растворе, мкг/см^3;

V_1 — конечный объем экстракта с учетом возможных разбавлений, мкдм^3;

V_3, V_2 — объемы стандартного раствора зеараленона и экстракта соответственно, с одинаковой интенсивностью флуоресценции, мкдм^3;

m — масса исследуемой пробы, соответствующая объему экстракта, подвергнутого очистке, г (12,5).

8.2 Флуороденситометрическое определение

Содержание зеараленона, X_1, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$X_1 = \frac{m_1 V_1}{m V_2}, \quad (3)$$

где m_1 — масса зеараленона в пятне экстракта (с учетом объема V_2), выявленная при определении, нг;

V_1 — конечный объем экстракта с учетом возможных разбавлений, мкдм^3;

m — масса исследуемой пробы, соответствующая объему экстракта, подвергнутого очистке, г (12,5);

V_2 — объем экстракта, наносимого на пластину, мкдм^3 (25 мкдм^3).

9 Точность

Международные испытания, проведенные в 20 лабораториях (из которых только 16 представили результаты, приемлемые для кукурузы В), каждая из которых провела 3 измерения, позволили получить статистические данные, приведенные в таблице 1.

Таблица 1

В микрограммах на килограмм

Проба	Кукуруза А	Кукуруза В (кукуруза А, разбавленная на 1/3)
Количество лабораторий, представивших необходимые результаты	20	15
Средняя величина	734	219
Стандартные отклонения повторяемости S_r	78	34
Коэффициент отклонения повторяемости	11 %	15 %
Повторяемость 2,83 S_r	221	96
Стандартное отклонение воспроизводимости или сходимости S_R	282	125
Коэффициент отклонения воспроизводимости или сходимости, %	38	57
Воспроизводимость или сходимость 2,83 S_R	798	354

Примечание — Кукуруза В — это кукуруза А, разбавленная 3 раза кукурузой, не содержащей зеараленон.

10 Оформление результатов испытания

В отчете об испытании должны быть указаны:

- используемый метод;
- полученные результаты;
- любые условия проведения испытаний, не установленные данным стандартом и касающиеся подробностей, которые могут повлиять на конечный результат.

В отчете должны быть все данные, необходимые для полной идентификации пробы.

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(справочное)

Библиография

[1] ИСО 6497 Корма для животных. Методы отбора проб

УДК 636.085.001.4 : 006.354 ОКС 65.120 С19 ОКСТУ 9709 9209 9296

Ключевые слова: корм, комбикорм, комбикормовое сырье, зеараленон, массовая концентрация, хроматографирование, метод

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Т.И. Кононенко*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Подписано в печать 29.09.2005. Формат 60×84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 0,93. Уч.-изд. л. 0,67. Тираж 41 экз. Зак. 204. С 1963.

ФГУП «Стандартинформ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано в издательстве на ПЭВМ
Отпечатано во ФГУП «Стандартинформ»

gost.e-ecolog.ru