Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение фумонизинов B_1 и B_2 в кукурузе (зерно, крупа, мука) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1962—05

Издание официальное

Москва • 2006

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение фумонизинов B_1 и B_2 в кукурузе (зерно, крупа, мука) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.1962—05

ББК 51.23
О60

О60 **Определение** фумонизинов B_1 и B_2 в кукурузе (зерно, крупа, мука) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006.—20 с.

ISBN 5—7508—0637—5

1. Разработаны: ГУ НИИ питания РАМН (академик РАМН, профессор В. А. Тутельян, д.х.н. К. И. Эллер, к.х.н. М. Г. Киселева., к.б.н. Л. П. Захарова, И. Б. Седова).

2. Утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Г. Г. Онищенко 21 апреля 2005 г.

3. Введены в действие с 1 июля 2005 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.23

Редакторы Н. Е. Акопова, Л. С. Кучурова
Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 13.12.06

Формат 60x88/16 Печ. л. 1,25

Тираж 500 экз. Заказ 47
(1-й завод 1—200 экз.)

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18/20

Оригинал-макет подготовлен к печати издательским отделом
и тиражирован отделом информационно-технического обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел. 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2006
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006

Содержание

1. Назначение и область применения 4
2. Общие положения 5
3. Принцип метода 5
4. Характеристика погрешностей измерения 6
5. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, реактивы и материалы 7
5.1. Средства измерений 7
5.2. Вспомогательное оборудование 7
5.3. Реактивы и материалы 8
6. Подготовка к выполнению измерений 9
6.1. Приготовление стандартных и рабочих растворов $ФВ_1$ и $ФВ_2$ 9
6.2. Хранение стандартных растворов фумонизинов 10
6.3. Приготовление буферных растворов 11
7. Отбор и подготовка проб для анализа 12
7.1. Отбор проб 12
7.2. Подготовка проб для анализа 12
8. Выполнение измерений 13
8.1. Дериватизация фумонизинов о-фталевым альдегидом 13
8.2. Определение фумонизинов B_1 и B_2 методом ВЭЖХ 13
9. Обработка результатов измерения 14
10. Вычисление результатов анализа 17
11. Оперативный контроль результатов измерения 18
11.1. Алгоритм проведения оперативного контроля воспроизводимости 18
11.2. Алгоритм проведения оперативного контроля погрешности 18
12. Требования техники безопасности 20
13. Требования к квалификации исполнителя 20
14. Условия выполнения измерений 20

УТВЕРЖДАЮ
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
Руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Г. Г. Онищенко
21 апреля 2005 г.
Дата введения: 1 июля 2005 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение фумонизинов B_1 и B_2 в кукурузе (зерно, крупа, мука) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания МУК 4.1.1962—05

1. Назначение и область применения

Настоящий документ устанавливает методику обнаружения, идентификации и количественного определения фумонизинов B_1 и B_2 в продовольственном сырье и пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Данная методика испытана и рекомендуется для количественного определения фумонизинов B_1 и B_2 ($ФB_1$ и $ФB_2$) в зерне кукурузы и продуктах переработки кукурузы.

Методические указания предназначены для проведения лабораторных исследований безопасности пищевой продукции центрами гигиены и эпидемиологии, а также для предприятий и организаций, осуществляющих контроль качества и безопасности пищевых продуктов и аккредитованных в установленном порядке.

Предел обнаружения метода: 0,01 мг/кг (для $ФB_1$); 0,04 мг/кг (для $ФB_2$).

Общая погрешность измерений не превышает 31 %.

2. Общие положения

Фумонизины принадлежат к большой группе микотоксинов, продуцируемых микроскопическими грибами рода *Fusarium*. Наиболее часто в природных условиях встречается фумонизин B_1, значительно, реже и в меньших количествах – фумонизины B_2 и B_3 ($ФB_1$, $ФB_2$ и $ФB_3$). Подтверждено, что основными продуцентами этих токсинов являются *F. moniliforme* Sheldon (син. *F verticillioides* (Sacc. Nirenberg). Имеются данные о высокой частоте обнаружения фумонизинов в зерне кукурузы и продуктах ее переработки в США, Австралии, в ряде стран Европы.

Фумонизины представляют собой диэфиры пропан-1,2,3-трикарбоновой кислоты и 2-амино-12,16-диметилполигидроксиэйкозана, хорошо растворимы в воде и полярных растворителях. Фумонизины не обладают естественной флуоресценцией и не имеют специфических хромофоров, что обусловливает необходимость стадии дериватизации для проведения высокочувствительного определения.

Фумонизины в экспериментах in vivo поражают печень, почки, поджелудочную железу и центральную нервную систему у разных видов животных, а также обладают канцерогенным действием. Международное Агентство по изучению рака классифицирует фумонизины, как соединения потенциально канцерогенные для человека (Группа 2В). Комитет экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам и контаминантам предложил установить величину допустимого суточного потребления (ДСП) $ФB_1 + ФB_2 + ФB_3$ с пищей на уровне 2 мкг/кг массы тела.

3. Принцип метода

Метод включает следующие этапы.

Экстракция $ФB_1$ и $ФB_2$ из проб зерна кукурузы, муки, крупы осуществляют смесью ацетонитрил–вода (50 : 50 % об.). В пробах детского питания и многокомпонентных пищевых продуктах – смесью ацетонитрил–метанол–вода (25 : 25 : 50 % об.):

- очистка и концентрирование пробы на патронах, заполненных силикагелем, химически связанным с октадецилселаном (ОДС-патроны). В пробах детского питания и многокомпонентных пищевых продуктах очистка проводится на иммунно-афинных колонках (ИА-колонки);

• дериватизация фумонизинов о-фталевым реагентом;

• определение $ФВ_1$ и $ФВ_2$ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуориметрическим детектором при длине волны возбуждения ($\lambda_{возб.}$) 335 нм и длине волны эмиссии ($\lambda_{эмис}$) 440 нм.

Предел обнаружения метода: 0,01 мг/кг (для $ФВ_1$); 0,04 мг/кг (для $ФВ_2$).

Относительное стандартное отклонение измерения времени удерживания составляет – 0,02 (для $ФВ_1$) и 0,03 (для $ФВ_2$), высот хроматографических пиков – 0,05 (для $ФВ_1$) и 0,08 (для $ФВ_2$), площадей хроматографических пиков – 0,06 (для $ФВ_1$) и 0,08 (для $ФВ_2$).

Степень извлечения добавленных в продукт фумонизинов составляет 89,8 % для $ФВ_1$ и 89,5 % для $ФВ_2$.

4. Характеристика погрешностей измерения

Данные методические указания обеспечивают выполнение измерений с погрешностью, не превышающей величин, приведенных в табл. 1.

Таблица 1

Приписанные характеристики погрешностей результатов определения концентрации $ФВ_1$ и $ФВ_2$ в продукте методом ВЭЖХ при доверительной вероятности P = 0,95

Концентрация, мг/кг	Токсин	Относительная погрешность, ± δ, %	
		Способ твердофазной экстракции	
		С18	ИА
0,1	$ФВ_1$ $ФВ_2$	7 –	31 29
0,5	$ФВ_1$ $ФВ_2$	8 18	11 15
1,0	$ФВ_1$ $ФВ_2$	13 11	8 13
5,0	$ФВ_1$ $ФВ_2$	13 3	17 17

5. Средства измерений, вспомогательные устройства, посуда, реактивы и материалы

5.1. Средства измерений

Система ВЭЖХ, состоящая из насоса высокого давления, инжектора типа Rheodyne-7125 (США) с объемом петли-дозатора 20 мкл, спектрофлуориметрического детектора, обеспечивающего возбуждение флуоресценции в спектральной области 330—340 нм и регистрацию эмиссии флуоресценции при длине волны 440 нм и системы для сбора и обработки данных типа Мультихром (Амперсенд, Россия) или аналогичной, хроматографической колонки (250 x 4,6 мм), заполненной сорбентом Kromasil C18 (MetaChem Texnologies, США), размер частиц 5 мкм, или подобным сорбентом.

Микрошприцы на МШ-10 или МШ-25 мкл для ВЭЖХ	
Дозатор пипеточный от 1 до 5 мл	
Дозатор пипеточный от 40 до 200 мкл	
Цилиндры мерные с притертой пробкой вместимостью 100 мл тип 2—100 и 2—250	ГОСТ 1770—74

5.2. Вспомогательное оборудование

Аппарат для встряхивания проб типа АВУ-6С или аналогичный	ТУ 64-1-2451
Ротационный испаритель ИР-1М с ловушкой или аналогичный	ТУ 25-11917
Мельница лабораторная роторная «Амита-04» или аналогичная	
Центрифуга лабораторная, обеспечивающая скорость вращения 2 500 об./мин	
Система для твердофазной экстракции (вакуумная или аналогичная)	
Электрошкаф сушильный лабораторный с погрешностью поддержания температуры ± 2,5 в интервале от 50 до 350 °С	ТУ 16-531.639
Холодильник бытовой	ГОСТ 16317
Мельница лабораторная электрическая ЭМ-3А или аналогичная	ТУ 46-22-236—79
pH-Метр MP 230 (Испания) или аналогичный	

ОДС-патроны (Германия), плотность прививки групп – 1,6 мкмоль/м^2, содержание углерода – 18,5 %, средний размер частиц – 58 мкм, масса сорбента в патроне – 100 мг	
Иммунно-афинные колонки Fumoniprep (R-Biopharm, Германия)	
Магнитная мешалка типа ММ 5 с перемешивающим стержнем	ТУ 25-11.834—80
Колбы плоскодонные конические, 100 мл, НШ 29, тип КнКШ 100/29/32	ГОСТ 10394—74
Пробирки центрифужные, 10 мл	ГОСТ 1770
Флаконы стеклянные завинчивающиеся из темного стекла, объемом 4 мл (вайлы)	
Флаконы стеклянные завинчивающиеся из темного стекла, объемом 7 мл	
Колбы мерные, вместимостью 100, 500 мл тип 2-100-2, 2-500-2	ГОСТ 1770—74

5.3. Реактивы и материалы

Стандарт ФВ$_1$, фирмы «Sigma», кат. № F 1147	
Стандарт ФВ$_2$, фирмы «Sigma», кат. № F 3771	
Стандартные растворы ФВ$_1$ и ФВ$_2$ в смеси ацетонитрил–вода (50 : 50 % об.), с концентрацией 10 мг/л	
Воронки лабораторные	ГОСТ 25336
Фильтры обеззоленные «синяя лента»	ТУ 6-09—1678
Натрий фосфорно-кислый двузамещенный, 12-водный, чда	ГОСТ 4172—76
Натрий фосфорно-кислый однозамещенный, 2-водный, чда	ГОСТ 245—76
Натрий хлорид, хч	ГОСТ 4233—77
Тетраборат натрия 10-водный, хч	ГОСТ 4199—76
Ацетонитрил, осч, сорт 0, УФ-поглощение на 200 нм о.е./1 см	
Метанол, осч	ГОСТ 6995—77
о-Фталевый альдегид, фирмы «Sigma», кат. № 0657	

2-Меркапэтанол, фирмы «Fluka», чистота более 99 %	
Ортофосфорная кислота, осч	ТУ 2612-014-00203677—97
Натрий гидроксид, хч	ГОСТ 4328—77
0,1 М фосфатный буферный раствор, pH 3,0	
0,1 М фосфатный буферный раствор, pH 3,0	
0,08 М фосфатный буферный раствор, pH 4,5	
0,025 М фосфатный буферный раствор, pH 7,0	
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026

6. Подготовка к выполнению измерений

6.1. Приготовление стандартных и рабочих растворов $ФВ_1$ и $ФВ_2$

Для приготовления стандартных растворов микотоксинов рекомендуется использовать растворители, очищенные перегонкой.

Для получения раствора хранения фумонизинов с концентрацией 50 мг/л в мерную колбу вместимостью 100 мл помещают навеску фумонизина (5 мг), взятую с точностью до 0,01 мг, приливают небольшое количество смеси ацетонитрил–вода (1 : 1) и тщательно перемешивают до полного растворения вещества, доводят смесь до метки.

Для получения исходных рабочих растворов фумонизинов с концентрацией стандарта 10 мг/л следует в 5 раз разбавить раствор хранения фумонизинов.

Из исходных рабочих растворов $ФВ_1$ и $ФВ_2$ с концентрациями 10 мг/л сначала готовится их смесь в соотношении (1 : 1), а затем путем последовательного разбавления этой смеси готовят рабочий стандартный раствор, для чего необходимую аликвоту смеси микотоксинов доводят до соответствующего объема смесью ацетонитрил–вода (1 : 1) согласно табл. 2.

Например: для приготовления смеси стандартных растворов $ФВ_1$ и $ФВ_2$ с концентрациями по 5 мг/л в вайл вносят по 1 мл исходных рабочих растворов $ФВ_1$ и $ФВ_2$ с концентрациями 10 мг/л.

Для приготовления смеси рабочих стандартных растворов $ФВ_1$ и $ФВ_2$ с концентрацией:

- 2,0 мг/л – в вайл вносят 800 мкл смеси $ФВ_1$ и $ФВ_2$ с концентрацией 5 мг/л и добавляют 1 200 мкл смеси ацетонитрил–вода (1 : 1);

• 1,0 мг/л – в вайл вносят 400 мкл смеси $ФВ_1$ и $ФВ_2$ с концентрацией 5 мг/л и добавляют 1 600 мкл смеси ацетонитрил–вода (1 : 1) или 1 000 мкл смеси рабочих стандартных растворов $ФВ_1$ и $ФВ_2$ с концентрацией 2 мг/л добавляют 1 000 мкл смеси ацетонитрил–вода (1 : 1);

• 0,4 мг/л – в вайл вносят 800 мкл смеси $ФВ_1$ и $ФВ_2$ с концентрацией 1 мг/л и добавляют 1 200 мкл смеси ацетонитрил–вода (1 : 1);

• 0,2 мг/л – в вайл вносят 1 000 мкл смеси $ФВ_1$ и $ФВ_2$ с концентрацией 0,4 мг/л и добавляют 1 000 мкл смеси ацетонитрил–вода (1 : 1). При необходимости по аналогии с вышеизложенным делается нужное разбавление.

Таблица 2

Приготовление рабочих растворов $ФВ_1$ и $ФВ_2$

Получаемые концентрации смеси стандартных растворов $ФВ_1$ и $ФВ_2$, мг/л	Приготовление смеси стандартных растворов
5,0	1 мл $ФВ_1$ (с = 10 мг/л) + 1 мл $ФВ_2$ (с = 10 мг/л)
2,0	800 мкл смеси $ФВ_1$ и $ФВ_2$ (с = 5 мг/л) + 1 200 мкл смеси ацетонитрил–вода (1 : 1)
1,0	400 мкл смеси $ФВ_1$ и $ФВ_2$ (с = 5 мг/л) + 1 600 мкл смеси ацетонитрил–вода (1 : 1) или 1 000 мкл смеси $ФВ_1$ и $ФВ_2$ (с = 2 мг/л) + 1 000 мкл смеси ацетонитрил–вода (1 : 1)
0,4	800 мкл смеси $ФВ_1$ и $ФВ_2$ (с = 1 мг/л) + 1 200 мкл смеси ацетонитрил–вода (1 : 1)
0,2	1 000 мкл смеси $ФВ_1$ и $ФВ_2$ (с = 0,4 мг/л) + 1 000 мкл смеси ацетонитрил–вода (1 : 1)

6.2. Хранение стандартных растворов фумонизинов

Растворы хранения фумонизинов следует держать в стеклянной посуде с притертыми пробками в темном прохладном месте (при температуре около 0 °С) до одного года и использовать для приготовления рабочих стандартных растворов. Смеси рабочих стандартных растворов хранят в вайлах из темного стекла в темном прохладном месте (при температуре около 0 °С) в течение 1 недели.

Перед использованием рабочих стандартных растворов их следует довести до комнатной температуры и только после этого следует открывать пробки.

6.3. Приготовление буферных растворов

6.3.1. Приготовление 0,1 М фосфатного буферного раствора, pH = 3,0

Навеску натрия фосфорно-кислого однозамещенного, 2-водного массой 7,8 г переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл, добавляют 20—50 мл дистиллированной воды. Доводят объем раствора в колбе до метки и перемешивают. Срок хранения – 1 месяц в холодильнике.

6.3.2. Приготовление 0,08 М фосфатного буферного раствора, pH = 4,5

Навеску натрия фосфорно-кислого однозамещенного, 2-водного массой 6,24 г переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл, добавляют 20—50 мл дистиллированной воды. Доводят объем раствора в колбе до метки и перемешивают. Срок хранения – 1 месяц в холодильнике.

6.3.3. Приготовление 0,025 М фосфатного буферного раствора, pH = 7,0

Навеску натрия фосфорно-кислого двузамещенного 12-водного массой 0,895 г переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 10—20 мл дистиллированной воды. Доводят объем раствора в колбе до метки и перемешивают. Срок хранения – 1 месяц в холодильнике.

6.3.4. Приготовление фосфатного буферного раствора, pH = 7,4

Навеску натрия фосфорно-кислого двузамещенного 12-водного массой 1,15 г, навеску натрия однозамещенного 2-водного массой 0,124 г и навеску натрия хлорида массой 1,74 г переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 10—20 мл дистиллированной воды. Доводят объем раствора в колбе до метки и перемешивают. Срок хранения – 1 месяц в холодильнике.

7. Отбор и подготовка проб для анализа

7.1. Отбор проб

Для учета специфики отбора проб отдельных видов продуктов следует руководствоваться действующей нормативно-технической документацией:

- «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ 13586.3—83;
- «Крупа. Правила приемки и методы отбора проб», ГОСТ 27312—84;
- «Мука и отруби. Приемка и методы отбора проб», ГОСТ 27668—88;
- «Продукты пищевые консервированные. Отбор проб и подготовка их к испытанию», ГОСТ 8756.0—70.

Для получения среднего образца зерна, представительного по концентрации микотоксинов для всей партии, следует измельчить до гомогенизированного состояния двухкилограммовый исходный образец и выделить из этого размола средний образец зерна.

Для однородных продуктов (мука, крупа, детское питание, хлопья и др.) пробы следует отбирать в количестве единиц упаковки, соответствующих величине среднего образца (100—200 г), при условии, что продукт происходит из одной партии.

7.2. Подготовка проб для анализа

Отобранные пробы измельчают в течение 1—2 мин в лабораторной мельнице. При этом используют две параллельные пробы и одну – холостую.

7.2.1. Экстракция

7.2.1.1. Для однокомпонентных пищевых продуктов: навеску 10 г измельченной пробы помещают в плоскодонную коническую колбу на 100 мл, добавляют 50 мл смеси ацетонитрил–вода (50 : 50 % об.). Экстрагируют на аппарате для встряхивания проб в течение 90 мин. Полученную смесь фильтруют через бумажный складчатый фильтр «синяя лента». Отбирают 5 мл фильтрата и добавляют 5 мл 0,1 М фосфатного буферного раствора, pH = 3,0. Полученный раствор центрифугируют в течение 15 мин при 2,5 тыс. об./мин.

7.2.1.2. Для проб детского питания и многокомпонентных пищевых продуктов экстракцию $ФВ_1$ и $ФВ_2$ из 10 г измельченной пробы проводят встряхиванием в 50 мл смеси ацетонитрил–метанол–вода (25 : 25 : 50 % об.) в течение 120 мин. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента». К 2 мл супернатанта добавляют 8 мл фосфатного буферного раствора, pH = 7,4 и центрифугируют в течение 15 мин при 2,5 тыс. об./мин.

7.2.2. Очистка экстракта

7.2.2.1. Для однокомпонентных пищевых продуктов: перед использованием ОДС-патроны предварительно кондиционируют, пропуская последовательно по 2 мл ацетонитрила и 0,1 М фосфатного буферного раствора, pH = 3,0. Затем на патрон наносят 8,0 мл анализируемого экстракта и промывают 1,0 мл 0,1 М фосфатным буферным раствором, pH = 3. Фумонизины элюируют с патрона 2,0 мл смеси ацетонитрил–0,025 М фосфатного буферного раствора, pH = 7,0 (70 : 30 % об.).

7.2.2.2. Для очистки проб детского питания и многокомпонентных пищевых продуктов на ИА-колонку наносят со скоростью 1—2 капли в секунду 8 мл полученного раствора, промывают 10 мл фосфатного буферного раствора, pH = 7,4. Фумонизины элюируют с колонки 1,5 мл метанола и 1,5 мл дистиллированной воды.

8. Выполнение измерений

8.1. Дериватизация фумонизинов о-фталевым альдегидом

Для приготовления ОФА-реагента 40 мг о-фталевого альдегида растворяют в 1 мл метанола, добавляют 5 мл 0,05 М водного раствора тетрабората натрия и 50 мкл 2-меркаптоэтанола. Полученный раствор хранят в темноте в течение 1 недели при t = 6 °С.

Дериватизацию фумонизинов о-фталевым альдегидом проводили в течение 1 мин после смешивания 40 мкл пробы и 40 мкл ОФА-реагента.

8.2. Определение фумонизинов B_1 и B_2 методом ВЭЖХ

Условия ВЭЖХ: подвижная фаза ацетонитрил–метанол–0,08 М фосфатный буферный раствор (50 : 10 : 40 % об.), pH 4,5, скорость подвижной фазы 1,3 мл/мин. Рекомендуется использовать перегнан-

ный метанол, ацетонитрил и бидистиллированную воду. Все растворители необходимо предварительно отфильтровать.

Флуориметрический детектор устанавливают на длину волны возбуждающего излучения 335 нм, на линии эмиссии устанавливают эмиссионный фильтр с полосой пропускания 440 нм.

9. Обработка результатов измерения

9.1. Для построения калибровочного графика проводят хроматографический анализ серии рабочих растворов стандартов. В инжектор с помощью микрошприца вводят 20 мкл перемешенной в течение 1 мин смеси, состоящей из 40 мкл ОФА-реагента и 40 мкл рабочего раствора стандарта с концентрацией 5 мг/л, что соответствует 100 нг $ФВ_1$ и 100 нг $ФВ_2$. Подобное делается для других стандартных растворов с концентрациями по 2,0, 1,0, 0,4, 0,2 мг/л, что в свою очередь соответствует 40, 20, 8 и 4 нг $ФВ_1$ и $ФВ_2$ во вколе. На основании полученных данных строят калибровочную кривую (зависимость площади хроматографического пика от концентрации фумонизина во вколе). В интервале линейности градуировочный график описывается уравнением прямой:

$$S = a \cdot c + b, \text{ где}$$

S – площадь хроматографического пика;

c – концентрация фумонизина в очищенном экстракте, мг/кг;

a, b – коэффициенты градуировочного графика.

Для анализа проб в инжектор хроматографа вводят с помощью микрошприца 20 мкл смеси, перемешенной в течение 1 мин и состоящей из 40 мкл ОФА-реагента и 40 мкл очищенного экстракта. При наличии пика, совпадающего по времени удерживания с $ФВ_1$ или $ФВ_2$, рассчитывают их концентрацию в очищенном экстракте с помощью уравнения градуировочного графика.

Для того чтобы рассчитать содержание фумонизинов в исходном образце необходимо концентрацию $ФВ_1$ и $ФВ_2$ в пробе умножить на коэффициент разбавления.

9.2. Коэффициент разбавления в случае использования С-18 колонок:

$$Kp = \frac{V_1 \cdot V_3 \cdot V_s}{M \cdot V_2 \cdot V_4} = 2{,}5 \text{, где}$$

Кр – коэффициент разбавления;

V_1 – объем смеси ацетонитрил–вода, взятой для экстракции, мл (50 мл);

М – навеска образца, взятого для анализа, г (10 г);

V_2 – объем водно-ацетонитрильного экстракта, взятого для анализа, мл (5 мл);

V_3 – объем смеси водно-ацетонитрильного экстракта и фосфатного буфера, взятых для центрифугирования, мл (10 мл);

V_4 – объем смеси после центрифугирования, взятой для твердофазной очистки, мл (8 мл);

V_5 – объем собранного элюата после стадии твердофазной очистки, мл (2 мл).

Расчет концентрации $ФВ_1$ и $ФВ_2$ в пробе проводится по формуле:

$$C_{(ФВ_1)} = 2{,}5 \cdot C_{э(ФВ_1)}$$

$$C_{(ФВ_2)} = 2{,}5 \cdot C_{э(ФВ_2)}, \text{ где}$$

С – концентрация $ФВ_1$ и $ФВ_2$, мг/кг;

2,5 – коэффициент разбавления;

$C_{э\,(ФВ_1)}$ – концентрация $ФВ_1$ в очищенном экстракте, мг/кг;

$C_{э\,(ФВ_2)}$ – концентрация $ФВ_2$ в очищенном экстракте, мг/кг.

При высоких уровнях загрязнения фумонизинами кукурузы или продуктов ее переработки, экстракт перед реакцией дериватизации необходимо разбавить, в этом случае при расчете содержания фумонизинов в исходном образце, необходимо дополнительно учесть это разбавление ($K_{д.р}$).

$$C_{(ФВ_1)} = 2{,}5 \cdot K_{д.р.} \cdot C_{э(ФВ_1)}$$

$$C_{(ФВ_2)} = 2{,}5 \cdot K_{д.р} \cdot C_{э(ФВ_2)}, \text{ где}$$

$K_{д.р.}$ – коэффициент дополнительного разбавления экстракта.

В указанных условиях время удерживания находится для $ФВ_1$ в диапазоне от 7,0 до 8,5, для $ФВ_2$ – 24—27 мин. Примерный вид хроматограммы, полученной с помощью модельной смеси, где $C(ФВ_1) = C(ФВ_2) = 0{,}5$ мг/кг, представлен на рис. 1.

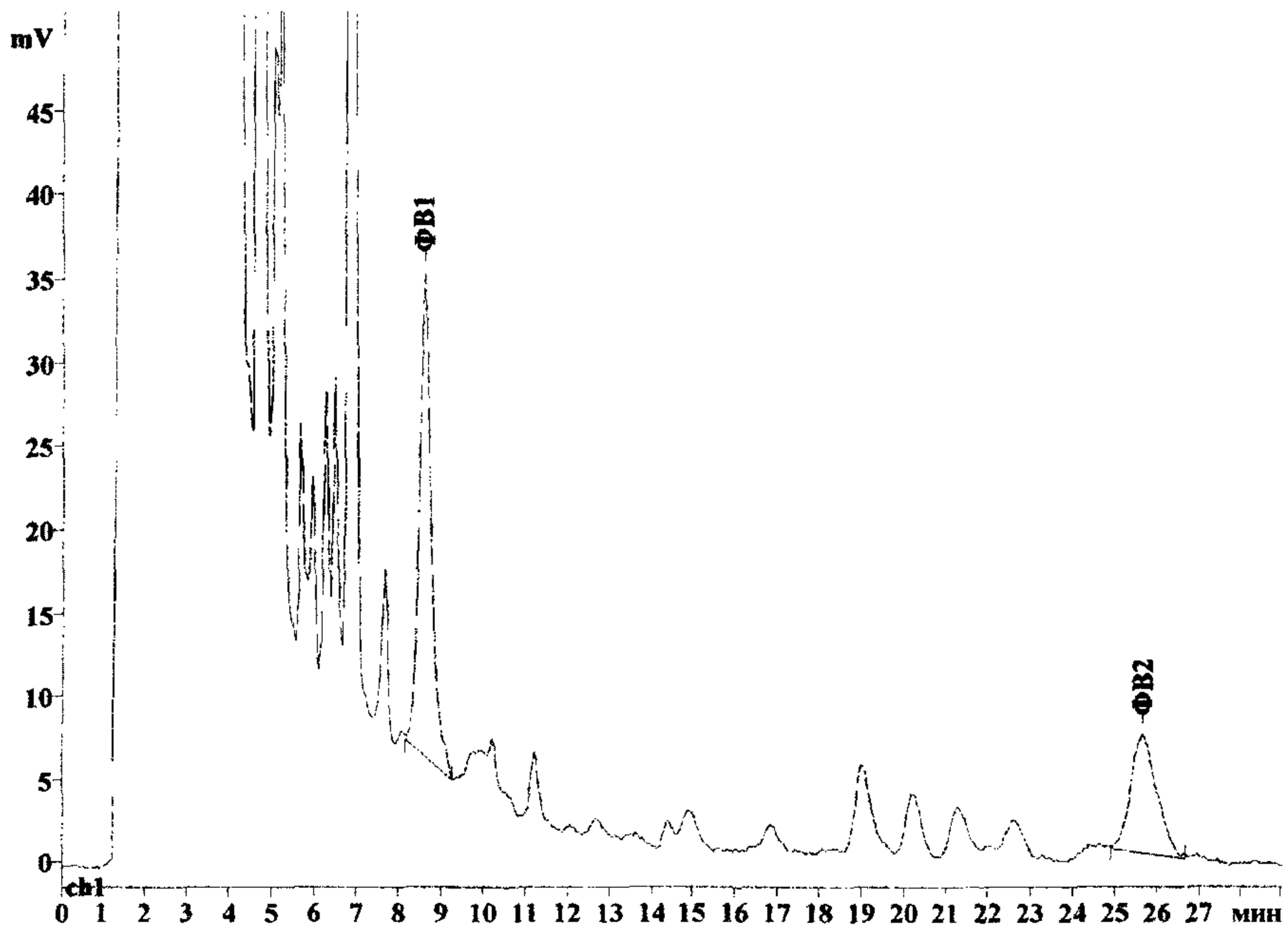

Рис. 1. Вид хроматограммы на примере модельной смеси

9.2. Коэффициент разбавления в случае использования ИА-колонок:

$$Kp = \frac{V_1 \cdot V_3 \cdot V_5}{M \cdot V_2 \cdot V_4} = 9{,}375$$

Kp – коэффициент разбавления;

V_1 – объем смеси ацетонитрил–метанол–вода, взятой для экстракции, мл (50 мл);

M – навеска образца, взятого для анализа, г (10г);

V_2 – объем ацетонитрил–метанол–водного экстракта, взятого для анализа, мл (2 мл);

V_3 – объем смеси ацетонитрил–метанол–водного экстракта и фосфатного буферного раствора, взятых для центрифугирования, мл (10 мл);

V_4 – объем смеси после центрифугирования, взятой для твердофазной очистки, мл (8 мл);

V_5 – объем собранного элюата после стадии твердофазной очистки, мл (3 мл).

Расчет концентрации $ФВ_1$ и $ФВ_2$ в пробе проводится по формуле:

$$C_{(ФВ_1)} = 9{,}375 \cdot C_{э(ФВ_1)}$$

$$C_{(ФВ_2)} = 9{,}375 \cdot C_{э(ФВ_2)}, \text{ где}$$

C – концентрация $ФВ_1$ и $ФВ_2$, мг/кг;

9,375 – коэффициент разбавления;

$C_{э\ (ФВ_1)}$ – концентрация $ФВ_1$ в очищенном экстракте, мг/кг;

$C_{э\ (ФВ_2)}$ – концентрация $ФВ_2$ в очищенном экстракте, мг/кг.

При высоких уровнях загрязнения фумонизинами кукурузы или продуктов ее переработки экстракт перед реакцией дериватизации необходимо разбавить, в этом случае при расчете содержания фумонизинов в исходном образце необходимо дополнительно учесть это разбавление ($K_{д\,р}$).

$$C_{(ФВ_1)} = 9{,}375 \cdot K_{д\,р} \cdot C_{э(ФВ_1)}$$

$$C_{(ФВ_2)} = 9{,}375 \cdot K_{д\,р} \cdot C_{э(ФВ_2)}, \text{ где}$$

$K_{д\,р}$ – коэффициент дополнительного разбавления экстракта.

10. Вычисление результатов анализа

За окончательный результат испытаний принимается среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений.

$$C_{(ФВ_1)\ ср} = (C_{(ФВ_1)1} + C_{(ФВ_1)2})/2$$

$$C_{(ФВ_2)\ ср} = (C_{(ФВ_2)1} + C_{(ФВ_2)2})/2$$

Определяют допустимое расхождение между параллельными определениями r, используя r, % из табл. 3.

$$r_1 = 0{,}01 \cdot (r_1, \%) \times C_{(ФВ_1)}, \text{ мг/кг}$$

$$r_2 = 0{,}01 \cdot (r_2, \%) \times C_{(ФВ_2)}, \text{ мг/кг}$$

Если расхождение между параллельными определениями не превышает допустимого:

$$|C_{(ФВ_1)1} - C_{(ФВ_1)\,2}| \le r_1,$$

$$|C_{(ФВ_2)1} - C_{(ФВ_2)2}| \le r_2,$$

то среднее арифметическое принимают за результат анализа.

Таблица 3

Значение нормативов оперативного контроля сходимости при доверительной вероятности P = 0,95

Концентрация, мг/кг	Токсин	Норматив оперативного контроля сходимости, r, %	
		Способ твердофазной экстракции	
		С18	ИА
		r_1, %	r_2, %
0,1	$ФВ_1$ $ФВ_2$	33 –	10 26
0,5	$ФВ_1$ $ФВ_2$	28 30	12 5
1,0	$ФВ_1$ $ФВ_2$	24 22	9 26
5,0	$ФВ_1$ $ФВ_2$	30 28	32 30

При превышении норматива r следует повторить измерения, используя резервные пробы. В случае повторного превышения указанного норматива, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам анализа, устраняют их и повторяют анализ пробы.

11. Оперативный контроль результатов измерения

11.1. Алгоритм проведения оперативного контроля воспроизводимости

Периодичность контроля воспроизводимости измерений зависит от количества рабочих измерений за контролируемый период и определяется планами контроля.

Пробами для контроля являются рабочие пробы продуктов, продовольственного сырья. Отбирают 2 пробы, которые анализируют в точном соответствии с прописью методики, максимально варьируя условия проведения анализа, а именно используя разные наборы мерной посуды, разные партии реактивов и участие двух разных аналитиков. Целесообразно также проведение анализа этих аналитических проб в разных лабораториях.

11.2. Алгоритм проведения оперативного контроля погрешности

Периодичность контроля погрешности измерений зависит от количества рабочих измерений за контролируемый период и определяется планами контроля.

Образцами контроля являются рабочие пробы пищевых продуктов или продовольственного сырья. Отбирают пробу и разделяют ее

на 2 равные части. Одну из них оставляют без изменений, а к другой добавляют раствор стандартов $ФВ_1$ и $ФВ_2$ в таком количестве, чтобы массовая доля каждого из них в пробе по сравнению с исходным значением увеличилась на 50—100 %. Добавка должна вводиться в пробу перед началом пробоподготовки.

Обе пробы анализируют в точном соответствии с прописью методики и получают результаты анализа исходной пробы ($C_{(ФВ_1)}$ и $C_{(ФВ_2)}$), мг/кг и пробы с добавкой ($C'_{(ФВ_1)}$ и $C'_{(ФВ_2)}$). Определение проводят в одинаковых условиях, а именно: анализ проводит один аналитик, с использованием одного набора мерной посуды, реактивов, растворов и т. д.

Алгоритм проведения оперативного контроля погрешности с использованием метода добавок состоит в сравнении результата контрольного определения, равного разности между результатом контрольного измерения пробы с добавкой ($C_{(ФВ_1)}$ и $C'_{(ФВ_2)}$), пробы без добавки ($C_{(ФВ_1)}$ и $C_{(ФВ_2)}$) и величиной добавки ($C_{доб\,(ФВ_1)}$ и $C_{доб\,(ФВ_2)}$), с нормативом оперативного контроля К. Решение об удовлетворительной погрешности принимается при выполнении условия (при Р = 0,95)

$$|C'_{(ФВ_1)} - C_{(ФВ_1)} - C_{доб\,(ФВ_1)}| \le K$$

$$|C'_{(ФВ_2)} - C_{(ФВ_2)} - C_{доб\,(ФВ_2)}| \le K$$

Норматив оперативного контроля погрешности рассчитывают по формулам при проведении:

- внутрилабораторного контроля (Р = 0,90)

$$K = 0{,}84 \times (\Delta^2 C'_{(ФВ_1)} + \Delta^2 C_{(ФВ_1)})^{1/2}, \text{ мг/кг}$$

$$K = 0{,}84 \times (\Delta^2 C'_{(ФВ_2)} + \Delta^2 C_{(ФВ_2)})^{1/2}, \text{ мг/кг;}$$

- внешнего контроля (Р = 0,95)

$$K = (\Delta^2 C'_{(ФВ_1)} + \Delta^2 C_{(ФВ_1)})^{1/2}, \text{ мг/кг}$$

$$K = (\Delta^2 C'_{(ФВ_2)} + \Delta^2 C_{(ФВ_2)})^{1/2}, \text{ мг/кг, где}$$

$\Delta^2 C'_{(ФВ_1)}$, $\Delta^2 C'_{(ФВ_2)}$ – абсолютные погрешности измерений для исходной пробы с добавкой, мг/кг;

$\Delta^2 C_{(ФВ_1)}$, $\Delta^2 C_{(ФВ_2)}$ – абсолютные погрешности измерений для исходной пробы, мг/кг;

$$\Delta^2 C_{(ФВ_1)} = 0{,}01\delta_{C\,(ФВ_1)} \times C_{(ФВ_1)}$$

$$\Delta^2 C_{(ФВ_2)} = 0{,}01\delta_{C\,(ФВ_2)} \times C_{(ФВ_2)}$$

$C_{(ФВ_1)}$, $C_{(ФВ_2)}$ – содержание определяемых компонентов в пробе;

$$\Delta^2 C'_{(ФВ_1)} = 0{,}01\delta_{C'\,(ФВ_1)} \times C'_{(ФВ_1)}$$

$$\Delta^2 C'_{(ФВ_2)} = 0{,}01\delta_{C\,(ФВ_2)} \times C'_{(ФВ_2)}$$

$\delta_{C\,(ФВ_1)}$ и $\delta_{C'\,(ФВ_2)}$ приведены в табл. 1.

При превышении норматива оперативного контроля погрешности эксперимент повторяют с использованием другой пробы. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля, и устраняют их.

12. Требования техники безопасности

При выполнении анализов необходимо соблюдать правила техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 12.2.007.0 и ГОСТ 4658. Помещение лаборатории должно соответствовать санитарным правилам проектирования, оборудования, эксплуатации и содержания производственных и лабораторных помещений, предназначенных для проведения работ с органическими растворителями. Аналитическая лаборатория должна быть оснащена вентиляционными системами по ГОСТ 12.4.021.

13. Требования к квалификации исполнителя

К выполнению анализа $ФВ_1$ и $ФВ_2$ в пищевых продуктах допускаются лица со специальным высшим образованием или средним специальным образованием, владеющие техникой ВЭЖХ–анализа, прошедшие соответствующую подготовку и имеющие опыт работы в химической лаборатории.

14. Условия выполнения измерений

Температура окружающего воздуха от 15 до 25 °С.

Относительная влажность воздуха не более 80 % при 25 °С.

Атмосферное давление 730—760 мм рт. ст.

Напряжение электропитания: 210—220 В. Частота переменного тока: 45—50 ГЦ.