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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

ГОСТ
33287—
2015

ВИНО И ВИНОМАТЕРИАЛЫ

Определение содержания охратоксина А методом
высокоэффективной жидкостной хроматографии

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2019

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Обществом с ограниченной ответственностью «Люмэкс-маркетинг» (ООО «Люмэкс-маркетинг»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 18 июня 2015 г. № 47)

За принятие проголосовали:

| Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97 | Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97 | Сокращенное наименование национального органа по стандартизации |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Армения | AM | Минэкономики Республики Армения |
| Казахстан | KZ | Госстандарт Республики Казахстан |
| Киргизия | KG | Кыргызстандарт |
| Россия | RU | Росстандарт |
| Таджикистан | TJ | Таджикстандарт |

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 21 июля 2015 г. № 948-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33287—2015 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2017 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2019 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Стандартинформ, оформление, 2016, 2019



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 Отбор и подготовка пробы к испытанию | 2 |
| 4 Требования безопасности | 2 |
| 5 Сущность метода | 2 |
| 6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, стандартные образцы, реактивы, посуда и материалы | 2 |
| 7 Подготовка к проведению испытания..... | 3 |
| 8 Проведение испытания | 6 |
| 9 Обработка результатов испытания | 8 |
| 10 Метрологические характеристики | 8 |
| 11 Контроль качества результатов измерений | 9 |
| 12 Оформление результатов испытания | 9 |
| Приложение А (рекомендуемое) Определение коэффициента прохождения охратоксина А | 10 |
| Приложение Б (справочное) Пример хроматограммы..... | 11 |

ВИНО И ВИНМАТЕРИАЛЫ**Определение содержания охратоксина А методом высокоэффективной жидкостной хроматографии**

Wine and wine materials. Determination of ochratoxin A content by high performance liquid chromatography

Дата введения — 2017—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на вино и виноматериалы и устанавливает метод определения массовой концентрации охратоксина А при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (далее — ВЭЖХ).

Диапазон измерений массовой концентрации охратоксина А составляет от 0,001 до 0,1 мг/дм³.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.010 Система стандартов безопасности труда. Взрывобезопасность. Общие требования

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

ГОСТ 61 Кислота уксусная. Технические условия

ГОСТ 1770 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 4204 Реактивы. Кислота серная. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 6709 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9293 (ИСО 2435—73) Азот газообразный и жидкий. Технические условия

ГОСТ 16317 Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные. Типы. Основные параметры и размеры

ГОСТ 29227 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ 31730 Продукция винодельческая. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ ISO 3696 Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля

ГОСТ ISO/IEC 17025 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ ИСО 5725-6—2003¹⁾ Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (www.eurasia.org) или по указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Отбор и подготовка пробы к испытанию

Отбор проб по ГОСТ 31730.

Вина с повышенным содержанием диоксида углерода предварительно дегазируют. Для этого 50 см³ продукта помещают в колбу с тубусом вместимостью 100 см³ (см. 6.22), встряхивают и подключают к вакуумному насосу (см. 6.6). Дегазируют в течение 10—15 мин до исчезновения пены и появления больших пузырей на поверхности жидкости.

4 Требования безопасности

При проведении измерений следует соблюдать требования:

- электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019 и технической документации на хроматограф;
- взрывобезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.010;
- пожарной безопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.004;
- безопасности при работе с вредными веществами в соответствии с ГОСТ 12.1.007.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — Охратоксин А вызывает поражение почек и печени и предположительно является канцерогеном. Все работы, связанные с подготовкой пробы и приготовлением растворов охратоксина А, следует проводить в вытяжном шкафу с использованием защитной одежды, перчаток и защитных очков. Деконтаминацию стеклянной посуды, контактировавшей с охратоксином А, проводят 4 %-ным раствором гипохлорита натрия.

5 Сущность метода

Метод основан на экстракции охратоксина А из пробы подкисленным хлористым метиленом, концентрировании полученного экстракта, скрининге проб и определении массовой концентрации охратоксина А с применением ВЭЖХ на обращенно-фазовой колонке с флуориметрическим детектированием.

6 Средства измерений, вспомогательное оборудование, стандартные образцы, реактивы, посуда и материалы

6.1 Хроматограф жидкостный с флуориметрическим или спектрофлуориметрическим детектором, обеспечивающим возбуждение флуоресценции в спектральной области (330 ± 20) нм и регистрацию интенсивности флуоресценции в спектральной области (465 ± 20) нм. Применяемый детектор должен обеспечивать предел обнаружения охратоксина А не более 5 нг/см³.

6.2 Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIML R 76-1 с пределами допускаемой абсолютной погрешности не более ±0,01 г.

6.3 Колонка хроматографическая аналитическая, заполненная обращенно-фазовым сорбентом с размером частиц 5 мкм, имеющая эффективность не менее 5000 теоретических тарелок по пику охратоксина А²⁾.

¹⁾ В Российской Федерации действует также ГОСТ Р ИСО 5725-6—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

²⁾ Пример коммерческого продукта, удовлетворяющего указанным требованиям, — хроматографическая колонка внутренним диаметром 2,1 мм и длиной 120 мм, заполненная обращенно-фазовым сорбентом Кромасил С-18, Alltima С18 и др. с размером частиц 5 мкм, снабженная предколонкой длиной 25 мм. Эта информация приведена для удобства пользователей настоящего стандарта и не является поддержкой указанного продукта.

6.4 Предколонка того же внутреннего диаметра и заполненная тем же обращенно-фазовым сорбентом, что и аналитическая колонка.

6.5 Испаритель ротационный, снабженный водяной баней с регулятором температуры в диапазоне от 20 °С до 50 °С.

6.6 Насос лабораторный вакуумный, мембранный или водоструйный по ГОСТ 25336, обеспечивающий разрежение от 2,5 до 10 кПа.

6.7 Шкаф сушильный, обеспечивающий температуру до 200 °С.

6.8 Холодильник бытовой по ГОСТ 16317.

6.9 Центрифуга лабораторная с частотой вращения не менее 5000 об/мин.

6.10 Межгосударственный или метрологически обеспеченный в национальной системе измерений государства, принявшего стандарт, государственный стандартный образец¹⁾ состава раствора охратоксина А в ацетонитриле массовой концентрации 50 мкг/см³ с погрешностью аттестованного значения не более ±2,5 мкг/см³. Допускается применение стандартных образцов состава раствора охратоксина А в других растворителях, что должно быть учтено при приготовлении исходного раствора по 7.3.1.

6.11 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или вода для лабораторного анализа степени чистоты 1 по ГОСТ ISO 3696.

6.12 Кислота уксусная по ГОСТ 61, ледяная.

6.13 Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, оптическая плотность относительно дистиллированной воды при 200 нм не более 0,025, массовая доля воды не более 0,03 %.

6.14 Хлористый метилен для высокоэффективной жидкостной хроматографии по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

6.15 Кислота серная по ГОСТ 4204, х. ч. или ч.д.а.

6.16 Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.

6.17 Пипетки градуированные 1-2-2-1, 1-2-2-2, 1-2-2-5, 1-2-2-10 или других типов и исполнений по ГОСТ 29227.

6.18 Цилиндры мерные 1-25-2, 1-50-2, 1-250-2 или других исполнений по ГОСТ 1770.

6.19 Колбы мерные 2-25-2, 2-50-2, 2-100-2, 2-500-2 по ГОСТ 1770.

6.20 Колбы остродонные О-10-14/23 и О-50-14/23 по ГОСТ 25336.

6.21 Колбы плоскодонные П-1-50-29/32, П-1-100-29/32, П-1-200-29/32, П-1-250-29/32 или Кн-1-50-29/32, Кн-1-100-29/32, Кн-1-250-29/32 по ГОСТ 25336.

6.22 Колбы с тубусом 2-100-19/26, 2-250-29/32 по ГОСТ 25336.

6.23 Воронки делительные типа ВД исполнений 1 или 3 вместимостью 50 см³ по ГОСТ 25336.

6.24 Воронки лабораторные типа В по ГОСТ 25336.

6.25 Фильтры бумажные «красная лента» по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

6.26 Стекланные емкости вместимостью 25, 50, 250, 1000 см³ с шлифованными стеклянными, фторопластовыми или полиэтиленовыми пробками по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

6.27 Часы песочные или таймер — по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками не хуже вышеуказанных и вспомогательного оборудования, реактивов и материалов с техническими характеристиками не хуже вышеуказанных.

7 Подготовка к проведению испытания

7.1 Подготовка стеклянной посуды

Посуду для приготовления и хранения подвижной фазы обрабатывают только серной кислотой по 6.15 без применения других моющих средств, тщательно промывают водопроводной водой и ополаскивают дистиллированной водой.

Остальную стеклянную посуду обрабатывают горячей водой с моющим средством, тщательно ополаскивают дистиллированной водой и сушат в сушильном шкафу при температуре 105 °С.

¹⁾ В Российской Федерации — стандартный образец утвержденного типа.

7.2 Приготовление вспомогательных растворов

7.2.1 Приготовление подвижной фазы

В заранее подготовленную стеклянную емкость вместимостью 1000 см³ с плотно закрывающейся шлифованной стеклянной, фторопластовой или полиэтиленовой пробкой помещают 5 см³ ледяной уксусной кислоты (см. 6.12), 215 см³ ацетонитрила (см. 6.13) и 280 см³ дистиллированной воды. Смесь тщательно перемешивают. При хранении подвижной фазы недопустимо использование резиновых или корковых пробок.

Срок хранения смеси при комнатной температуре — не более 1 мес.

Перед применением подвижную фазу дегазируют и фильтруют в соответствии с рекомендациями изготовителя хроматографа.

7.2.2 Приготовление смеси хлористого метилена и уксусной кислоты в объемном соотношении 200 : 1

В плоскодонную колбу вместимостью 250 см³ помещают 200 см³ хлористого метилена (см. 6.14) и 1,0 см³ ледяной уксусной кислоты (см. 6.12).

Срок хранения смеси при комнатной температуре в стеклянной емкости с шлифованной стеклянной, фторопластовой или полиэтиленовой пробкой — не более 1 мес.

7.2.3 Приготовление раствора хлористого натрия с массовой долей 20 %

В плоскодонную колбу вместимостью 200 см³ помещают 20 г хлористого натрия (см. 6.16), приливают 80 см³ дистиллированной воды, тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре — не более 3 мес.

7.3 Приготовление растворов охратоксина А

7.3.1 Приготовление исходного раствора охратоксина А с номинальным значением массовой концентрации 1 мкг/см³

Пипеткой отбирают 1 см³ стандартного образца состава раствора охратоксина А в ацетонитриле массовой концентрации 50 мкг/см³ (см. 6.10), помещают в мерную колбу вместимостью 50 см³ и доводят объем до метки ацетонитрилом (см. 6.13).

Срок хранения приготовленного раствора в холодильнике при температуре от 2 °С до 6 °С — не более 6 мес.

Фактическое значение массовой концентрации охратоксина А в исходном растворе ($C_{исх}$, мкг/см³) вычисляют по формуле

$$C_{исх} = \frac{C_{CO} V_{CO}}{V_{исх}}, \quad (1)$$

где C_{CO} — аттестованное значение массовой концентрации охратоксина А в стандартном образце по паспорту, мкг/см³;

V_{CO} — объем стандартного образца состава раствора охратоксина А, отобранный для приготовления исходного раствора, см³ (1 см³);

$V_{исх}$ — объем мерной колбы, использованной для приготовления исходного раствора, см³ (50 см³).

Примечание — При использовании стандартного образца состава раствора охратоксина А в других растворителях аликвоту (1 см³) упаривают до сухого остатка в вакууме при температуре водяной бани от 40 °С до 45 °С или в токе азота. Сухой остаток растворяют в 2 см³ ацетонитрила и перемешивают в течение 1 мин. Затем полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см³ и разбавляют до метки ацетонитрилом.

7.3.2 Приготовление раствора охратоксина А в подвижной фазе с номинальным значением массовой концентрации 50 нг/см³

В мерную колбу вместимостью 50 см³ помещают 2,5 см³ исходного раствора охратоксина А по 7.3.1 и доводят объем до метки подвижной фазой по 7.2.1.

Срок хранения полученного раствора в холодильнике при температуре от 2 °С до 6 °С — не более 3 мес.

Фактическое значение массовой концентрации охратоксина А в растворе (C_0 , нг/см³) вычисляют по формуле

$$C_0 = \frac{C_{исх} V_{исх}}{V_0} \cdot 1000, \quad (2)$$

где $C_{исх}$ — фактическое значение массовой концентрации охратоксина А в исходном растворе (см. 7.3.1), мкг/см³;

$V_{\text{исх}}$ — объем исходного раствора по 7.3.1, отобранный для приготовления данного раствора, см³ (2,5 см³);

V_0 — объем мерной колбы, использованной для приготовления исходного раствора, см³ (50 см³);

1000 — коэффициент согласования размерности единиц массы.

7.3.3 Приготовление градуировочных растворов охратоксина А

Исходный раствор охратоксина А в ацетонитриле по 7.3.1 помещают в мерную колбу вместимостью 50 см³. Объем раствора охратоксина А должен соответствовать требованиям таблицы 1.

Таблица 1

| Номер раствора | Объем исходного раствора по 7.3.1, см ³ | Номинальное значение массовой концентрации, нг/см ³ |
|----------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 1 | 5,0 | 100 |
| 2 | 2,0 | 40 |
| 3 | 1,0 | 20 |
| 4 | 0,5 | 10 |
| 5 | 0,25 | 5 |

Содержимое колбы разбавляют до метки подвижной фазой по 7.2.1 в соответствии с таблицей 1.

Срок хранения градуировочных растворов в холодильнике при температуре от 2 °С до 6 °С — не более семи дней.

П р и м е ч а н и е — При необходимости, например для внесения добавки охратоксина А в пробу (см. 8.2), допускается приготовление аналогичным способом растворов охратоксина А других концентраций.

Фактическое значение массовой концентрации охратоксина А в градуировочных растворах вычисляют по формуле (2), исходя из значений объемов исходного раствора по таблице 1.

Перед использованием растворы выдерживают до достижения комнатной температуры.

7.4 Подготовка хроматографа

Подготовку хроматографа к измерениям проводят в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации.

Устанавливают рабочие длины волн возбуждения и регистрации флуоресценции (см. 6.1). Объемную скорость подачи подвижной фазы и объем дозирования пробы задают в зависимости от типоразмеров колонки, руководствуясь указаниями изготовителя хроматографа и колонки. Например, для хроматографической колонки, приведенной в 6.3, рекомендуется значение объемной скорости 200 мм³/мин и объем петли крана-дозатора от 10 до 20 мм³. При наличии термостата колонок устанавливают температуру (25 ± 1) °С.

7.5 Градуировка хроматографа

Диапазон линейности градуировочной характеристики составляет от 5 до 100 нг/см³. В качестве образцов для градуировки хроматографа используют градуировочные растворы охратоксина А по 7.3.3.

Регистрируют по две хроматограммы каждого градуировочного раствора и, используя программное обеспечение к хроматографу, проводят градуировку хроматографа, устанавливая параметры градуировочной характеристики и время удерживания охратоксина А.

Рассчитывают коэффициент корреляции и отклонения рассчитанных значений массовой концентрации охратоксина А в каждой градуировочной точке от фактического значения в соответствии с процедурой приготовления градуировочных растворов (см. 7.3.3).

Градуировку считают приемлемой, если:

- коэффициент корреляции не менее 0,998;

- относительное отклонение рассчитанного значения массовой концентрации охратоксина А от фактического значения — не более ±10 %.

7.6 Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят ежедневно перед началом работы.

В качестве контрольного раствора используют раствор охратоксина А в подвижной фазе, приготовленный аналогично 7.3.3. Массовую концентрацию охратоксина А в контрольном растворе

выбирают, исходя из предполагаемого содержания охратоксина А в испытуемых пробах; рекомендуется использование раствора охратоксина А массовой концентрации 20 нг/см³.

Регистрируют не менее двух хроматограмм контрольного раствора и идентифицируют пик охратоксина А по времени удерживания при ширине окна идентификации 5 %, внося при необходимости программную коррекцию времени удерживания пика, и при помощи градуировочной характеристики рассчитывают массовую концентрацию охратоксина А для каждого ввода.

Повторяемость значений времени удерживания и значений массовой концентрации охратоксина А проверяют по формулам

$$\frac{|t_1 - t_2|}{\bar{t}} \leq 0,05, \quad (3)$$

где t_1 и t_2 — значения времени удерживания пика охратоксина А на первой и второй хроматограммах соответственно, мин;

\bar{t} — среднеарифметическое значение t_1 и t_2 , мин.

$$\frac{|C_{K1} - C_{K2}|}{\bar{C}_K} \leq 0,07, \quad (4)$$

где C_{K1} и C_{K2} — массовые концентрации охратоксина А в контрольном растворе по первой и второй хроматограммам соответственно, нг/см³;

\bar{C}_K — среднеарифметическое значений C_{K1} и C_{K2} , нг/см³.

Градуировочная зависимость признается стабильной, если выполняется условие

$$\frac{|\bar{C}_K - C|}{C} \leq 0,12, \quad (5)$$

где C — фактическое значение массовой концентрации охратоксина А в контрольном растворе, нг/см³.

Если условие (5) не выполняется, то процедуру контроля повторяют. Результаты повторного контроля считают окончательными и градуировку хроматографа по 7.5 проводят заново.

7.7 Контроль холостой пробы

Испытание холостой пробы проводят перед испытанием исследуемых проб.

В колбу для упаривания помещают 15 см³ смеси хлористого метилена и уксусной кислоты по 7.2.2 и упаривают в вакууме до сухого остатка, поместив колбу в водяную баню при температуре от 40 °С до 45 °С.

Сухой остаток растворяют в 0,5 см³ подвижной фазы по 7.2.1, выдерживают не менее 5 мин и проводят хроматографический анализ полученного концентрата по 8.3. Если на хроматограмме присутствуют пики, по времени удерживания близкие к пику охратоксина А, то находят и устраняют причины загрязнения холостой пробы.

Примечание — Наиболее распространенной причиной неудовлетворительного результата контроля холостой пробы является недостаточная чистота хлористого метилена, который может быть загрязнен примесями, имеющими близкие к охратоксину А значения времени удерживания. Такой хлористый метилен необходимо заменить или подвергнуть тщательной перегонке, собирая среднюю фракцию с температурой кипения от 39 °С до 40 °С.

8 Проведение испытания

8.1 Экстракция охратоксина А из пробы

В делительную воронку помещают пипеткой 5 см³ пробы, добавляют 5 см³ раствора хлористого натрия по 7.2.3, приливают 5 см³ смеси хлористого метилена и уксусной кислоты по 7.2.2 и встряхивают в течение 1 мин. После расслоения фаз нижний органический слой фильтруют через предварительно смоченный подкисленным хлористым метиленом фильтр «красная лента» в колбу для упаривания.

Примечание — При образовании стойкой эмульсии рекомендуется центрифугировать смесь в течение 2 мин при частоте вращения 5000 об/мин.

Повторяют экстракцию охратоксина А еще раз из верхнего слоя 5 см³ смеси уксусной кислоты и хлористого метилена по 7.2.2. Полученный экстракт фильтруют в ту же колбу для упаривания.

Фильтр промывают подкисленным хлористым метилом объемом от 5 до 10 см³. Экстракт упаривают до сухого остатка в вакууме, поместив колбу в водяную баню при температуре от 40 °С до 45 °С. Сухой остаток растворяют в 0,5 см³ подвижной фазы, получая таким образом концентрат пробы.

П р и м е ч а н и е — На стадии освоения метода, при смене партии экстрагента, а также при возникновении сомнений в достоверности получаемых результатов находят коэффициент прохождения охратоксина А в контрольной пробе в соответствии с приложением А и проверяют приемлемость полученного значения.

8.2 Проведение скрининга проб

Концентрат пробы вина, полученный по 8.1, выдерживают не менее 5 минут и затем проводят его хроматографический анализ по 8.3.

При отсутствии на хроматограмме пика, идентифицируемого как пик охратоксина А, делают вывод об отсутствии охратоксина А в пробе на уровне нижней границы диапазона измерений (0,001 мг/дм³) и пробу с добавкой охратоксина А не готовят.

Если на хроматограмме пробы обнаруживают пик, идентифицируемый программным обеспечением к хроматографу как пик охратоксина А (см. 8.3), то в анализируемую пробу вносят добавку в виде раствора охратоксина А в подвижной фазе (см. 7.3.2). Рекомендуемый объем добавки раствора охратоксина А ($V_{д.р}$, см³) вычисляют по формуле

$$V_{д.р} = \frac{q \cdot C_X \cdot V_K}{C_{ст}}, \quad (6)$$

где q — коэффициент, значение которого выбирают в диапазоне от 0,5 до 2,0;

C_X — массовая концентрация охратоксина А в концентрате пробы (см. 8.3), мг/см³;

V_K — объем концентрата пробы, см³ (0,5 см³);

$C_{ст}$ — массовая концентрация охратоксина А в растворе, используемом для внесения добавки, мг/см³.

Объем вносимой добавки не должен превышать 5 % от объема пробы ($V_{пр}$, см³). Если это требование не согласуется со значениями, рассчитанными по формуле (6), то для внесения добавки охратоксина А используют раствор с другим значением массовой концентрации.

Пробу с добавкой анализируют согласно 8.1.

8.3 Проведение хроматографических измерений

Регистрируют не менее двух хроматограмм концентрата испытуемой пробы (см. 8.1) и пробы с добавкой (см. 8.2), в тех же условиях, при которых была проведена градуировка хроматографа. Идентификацию охратоксина А проводят по совпадению времени удерживания охратоксина А в экстракте пробы с его временем удерживания, полученным при контроле стабильности градуировочной характеристики, установив ширину окна идентификации 5 %.

Пример хроматограммы приведен на рисунке Б.1 (приложение Б).

П р и м е ч а н и е — При необходимости подтверждения правильности идентификации пика охратоксина А рекомендуется выполнить добавку раствора охратоксина А в подвижной фазе к концентрату пробы. О достоверности идентификации можно судить по увеличению высоты предполагаемого пика охратоксина А. Количество добавляемого раствора охратоксина А определяют, исходя из того, что массовая концентрация охратоксина А в пробе должна увеличиться на 50—150 % по сравнению с исходным значением.

При наличии на хроматограмме концентрата пробы пика, идентифицированного как пик охратоксина А, вычисляют значение массовой концентрации охратоксина А в концентрате пробы для каждой зарегистрированной хроматограммы с использованием градуировочной характеристики, установленной по 7.5, и проверяют приемлемость полученных значений, используя неравенство (4). Если условие (4) выполняется, то в качестве результата измерений массовой концентрации охратоксина А в концентрате испытуемой пробы принимают среднеарифметическое значение полученных концентраций (C_X , мг/см³). Если условие формулы (4) не выполняется, то находят и устраняют причины нестабильности, после чего ввод концентрата пробы повторяют.

При анализе концентрата пробы с добавкой охратоксина А (см. 8.2) также регистрируют две хроматограммы, идентифицируют пик охратоксина А и рассчитывают значение массовой концентрации охратоксина в концентрате по каждой хроматограмме, проверяют приемлемость полученных значений и рассчитывают массовую концентрацию охратоксина А в концентрате пробы с добавкой ($C_{X+д}$, мг/дм³) как среднеарифметическое значение полученных значений.

Если массовая концентрация охратоксина А в концентрате пробы превышает 100 нг/см^3 , то пробу вина разбавляют водой по 6.11 и разбавленную пробу анализируют заново по 8.1. Коэффициент разбавления Q вычисляют по формуле

$$Q = \frac{V_p}{V_a}, \quad (7)$$

где V_p — объем разбавленной пробы, см^3 ;

V_a — объем аликвоты испытуемой пробы, взятый для разбавления, см^3 .

9 Обработка результатов испытания

Массовую концентрацию охратоксина А в пробе вина (X , мг/дм^3) вычисляют по формуле

$$X = \frac{C_{\text{ст}} \cdot V_d}{V_{\text{пр}}} \cdot \frac{C_X}{C_{X+d} - C_X} \cdot Q \cdot 10^{-3}, \quad (8)$$

где $C_{\text{ст}}$ — массовая концентрация раствора охратоксина А, использованного в качестве добавки (см. 8.2), нг/см^3 ;

V_d — объем добавки раствора охратоксина А к пробе (см. 8.2), см^3 ;

$V_{\text{пр}}$ — объем пробы, взятой для испытаний по 8.1, см^3 (5 см^3);

C_X — массовая концентрация охратоксина А в концентрате пробы (см. 8.3), нг/см^3 ;

C_{X+d} — массовая концентрация охратоксина А в концентрате пробы с добавкой (см. 8.3), нг/см^3 ;

Q — коэффициент разбавления пробы вина (см. 8.3). Если разбавление пробы не производили, то $Q = 1$;

10^{-3} — коэффициент согласования размерности единиц массы и объема.

10 Метрологические характеристики

Метод обеспечивает получение результатов измерений с метрологическими характеристиками, не превышающими значений, приведенных в таблице 2.

Таблица 2

| Диапазон измерений, мг/дм^3 | Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в условиях повторяемости при $P = 0,95$), $r_{\text{отн}}$, % | Критическая разность (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами измерений, полученными в условиях воспроизводимости при $P = 0,95$) $CD_{0,95}$, мг/дм^3 | Показатель точности (границы* относительной погрешности при доверительной вероятности $P = 0,95$), $\pm \delta$, % |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| От 0,001 до 0,005 включ. | 28 | 42 | 30 |
| Св. 0,005 » 0,1 » | 18 | 31 | 22 |
| * Установленные числовые значения границ относительной погрешности соответствуют числовым значениям относительной расширенной неопределенности $U_{\text{отн}}$ при коэффициенте охвата $k = 2$. | | | |

Расхождение между двумя результатами измерений (X_1 и X_2 , мг/дм^3), полученными в одной лаборатории в условиях повторяемости, должно соответствовать условию

$$100 \cdot \frac{|X_1 - X_2|}{\bar{X}} \leq r_{\text{отн}}, \quad (9)$$

где \bar{X} — среднее арифметическое X_1 и X_2 , мг/дм^3 ;

$r_{\text{отн}}$ — предел повторяемости (таблица 2), %.

При выполнении условия (9) за результат измерений принимают среднеарифметическое полученных результатов измерений (X_1 и X_2 , мг/дм^3).

Расхождение между двумя результатами измерений, полученными в двух лабораториях ($\bar{X}_{1\text{лаб}}$ и $\bar{X}_{2\text{лаб}}$, мг/дм^3) на идентичных пробах, должно соответствовать условию

$$100 \cdot \frac{|\bar{X}_{1\text{лаб}} - \bar{X}_{2\text{лаб}}|}{\bar{X}_{\text{лаб}}} \leq CD_{0,95}, \quad (10)$$

где $\bar{X}_{\text{лаб}}$ — среднее арифметическое $\bar{X}_{1\text{лаб}}$ и $\bar{X}_{2\text{лаб}}$, мг/дм³;
 $CD_{0,95}$ — критическая разность (таблица 2), %.

11 Контроль качества результатов измерений

Контроль показателей качества результатов измерений в лаборатории предусматривает проведение контроля стабильности результатов измерений с учетом требований ГОСТ ИСО 5725-6—2003 (раздел 6).

12 Оформление результатов испытания

Результаты испытаний регистрируют в протоколе испытаний, который оформляют в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025, при этом протокол испытаний должен содержать ссылку на настоящий стандарт.

Результаты измерений содержания охратоксина А (при подтвержденном в лаборатории соответствии аналитической процедуры требованиям настоящего стандарта) представляют в виде

$$\bar{X} \pm \Delta \text{ либо } \bar{X} \pm U, \quad (11)$$

где \bar{X} — результат измерений, полученный в соответствии с разделом 10, мг/дм³,

Δ — границы абсолютной погрешности измерений содержания охратоксина А ($P = 0,95$), мг/дм³, которые вычисляют по формуле

$$\bar{\Delta} = 0,01 \cdot \delta \cdot \bar{X}, \quad (12)$$

U — расширенная неопределенность при коэффициенте охвата $k = 2$, мг/дм³, которую вычисляют по формуле

$$\bar{U} = 0,01 \cdot U_{\text{отн}} \cdot \bar{X}. \quad (13)$$

Значения δ ($U_{\text{отн}}$) приведены в таблице 2.

Числовые значения границ абсолютной погрешности (неопределенности) выражают числом, содержащим не более двух значащих цифр, при этом наименьший разряд числового значения окончательного результата измерений принимают таким же, как и наименьший разряд числового значения границ абсолютной погрешности (неопределенности).

Приложение А
(рекомендуемое)

Определение коэффициента прохождения охратоксина А

Для определения коэффициента прохождения охратоксина А используют контрольную пробу, для приготовления которой в делительную воронку помещают 5 см³ дистиллированной воды, добавляют 5 см³ раствора хлористого натрия по 7.2.3 и вносят 0,5 см³ раствора охратоксина А массовой концентрации 50 нг/см³ в подвижной фазе (см. 7.3.2).

Проводят экстракцию охратоксина А по 8.1, приготавливают концентрат контрольной пробы по 8.2 и проводят его хроматографический анализ по 8.3 и, используя градуировочную характеристику по 7.5, вычисляют массовую концентрацию охратоксина А в концентрате контрольной пробы.

Затем вычисляют коэффициент прохождения охратоксина А (η) по формуле

$$\eta = \frac{V_1 \cdot C_x}{C_k \cdot V_k}, \quad (\text{A.1})$$

где V_1 — объем концентрата контрольной пробы, см³ (0,5 см³);

C_x — измеренное значение массовой концентрации охратоксина А в концентрате контрольной пробы, нг/см³.

C_k — значение массовой концентрации охратоксина А в растворе по 7.3.2, нг/см³;

V_k — объем раствора охратоксина А по 7.3.2, отобранный для приготовления контрольной пробы, см³ (0,5 см³).

Коэффициент прохождения охратоксина А определяют не менее трех раз в условиях повторяемости. Полученные значения должны соответствовать следующим требованиям:

- каждое из полученных значений не менее 0,8;
- относительное значение размаха полученных значений соответствует условию

$$\frac{|\eta_{\text{макс}} - \eta_{\text{мин}}|}{\bar{\eta}} \leq 0,10, \quad (\text{A.2})$$

где $\eta_{\text{макс}}$ и $\eta_{\text{мин}}$ — наибольшее и наименьшее из полученных значений коэффициента прохождения охратоксина А;

$\bar{\eta}$ — среднеарифметическое полученных значений коэффициента прохождения охратоксина А.

Если оба этих условия выполняются, то проведение операций по 8.1 считают удовлетворительным. В противном случае находят причины потерь охратоксина А и повторяют определение коэффициента прохождения.

Приложение Б
(справочное)

Пример хроматограммы

На рисунке Б.1 приведен пример хроматограммы концентрата пробы вина красного полусладкого (массовая концентрация охратоксина А в пробе 0,0010 мг/дм³).

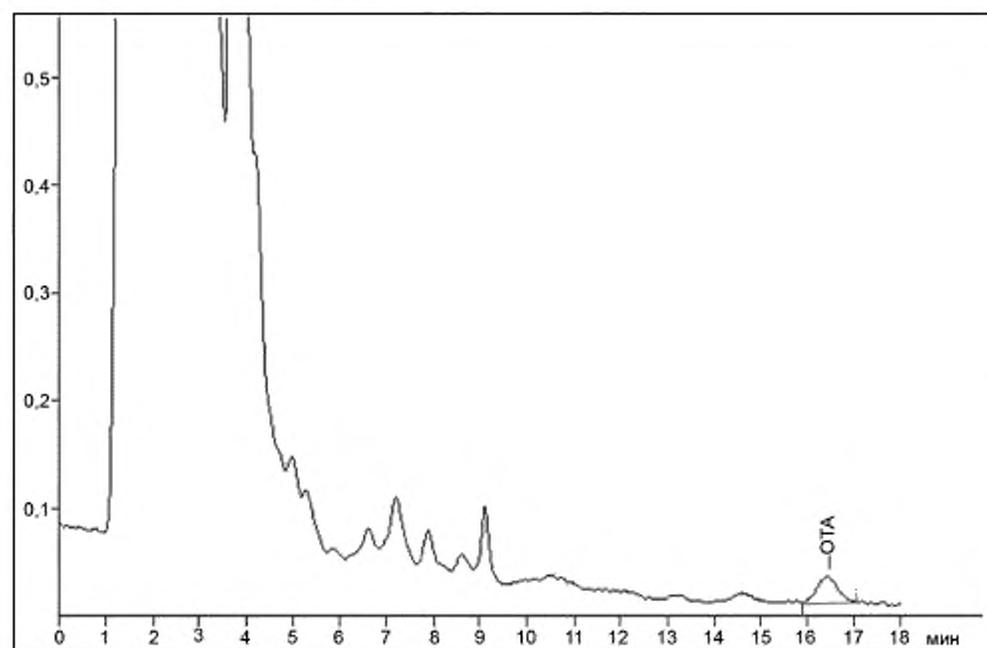


Рисунок Б.1 — Пример хроматограммы

Пик охратоксина А (на рисунке обозначен как ОТА) соответствует значению массовой концентрации охратоксина А в концентрате 7,7 нг/см³.

Ключевые слова: вино, виноматериалы, методы испытаний, высокоэффективная жидкостная хроматография, охратоксин А, экстракция охратоксина А, определение массовой концентрации охратоксина А, концентрирование экстракта, скрининг проб, флуориметрическое детектирование

Редактор *Ю.А. Расторгуева*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 29.11.2019. Подписано в печать 05.12.2019. Формат 60×84¹/₈. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,68.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта