
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ
СТАНДАРТ
РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р
53955—
2010
(ИСО 15302:2007)

ЖИРЫ И МАСЛА ЖИВОТНЫЕ И РАСТИТЕЛЬНЫЕ

**Определение содержания бенз(а)пирена.
Метод с применением высокоразрешающей
жидкостной хроматографии с обратной фазой**

ISO 15302:2007

**Animal and vegetable fats and oils — Determination of benzo(a)pyrene —
Reverse-phase high performance liquid chromatography method
(MOD)**

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2011

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН ОАО «Всероссийский научно-исследовательский институт сертификации» (ОАО «ВНИИС») и Государственным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт жиров Российской академии сельскохозяйственных наук» (ГНУ ВНИИЖ Россельхозакадемии) на основе аутентичного перевода на русский язык международного стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 24 ноября 2010 г. № 507-ст

4 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ИСО 15302:2007 «Жиры и масла животные и растительные. Определение содержания бенз(а)пирена. Метод с применением высокоразрешающей жидкостной хроматографии с обратной фазой» (ISO 15302:2007 «Animal and vegetable fats and oils — Determination of benzo(a)pyrene—Reverse-phase high performance liquid chromatography method») путем изменения структуры, содержания отдельных структурных элементов, слов, фраз для учета особенностей национальной экономики и национальной стандартизации Российской Федерации, выделенных в тексте курсивом.

Сравнение структуры настоящего стандарта со структурой указанного международного регионального стандарта приведено в дополнительном приложении Б

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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 (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартиформ, 2011

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 Термины и определения	1
4 Сущность метода	2
5 Реактивы	2
6 Подготовка к измерению	2
7 Средства измерения и оборудование	3
8 Отбор проб	3
9 Подготовка пробы для определения	3
10 Проведение определения	4
11 Обработка результатов	5
12 Точность	5
Приложение А (справочное) Результаты межлабораторных испытаний	6
Приложение Б (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного стандарта	7
Библиография	8

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ЖИРЫ И МАСЛА ЖИВОТНЫЕ И РАСТИТЕЛЬНЫЕ

Определение содержания бенз(а)пирена.

Метод с применением высокоразрешающей жидкостной хроматографии с обратной фазой

Animal and vegetable fats and oils. Determination of benzo(a)pyrene.
Reverse-phase high performance liquid chromatography method

Дата введения — 2012—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения бенз(а)пирена в неочищенных и рафинированных пищевых животных и растительных маслах и жирах при помощи высокоразрешающей жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с обратной фазой с использованием флуориметрического определения в диапазоне от 0,1 мкг/кг до 50 мкг/кг.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ Р 52062—2003 *Масла растительные. Правила приемки и методы отбора проб*

ГОСТ Р ИСО 52501—2005 (ИСО 3696:1987) *Вода для лабораторного анализа. Технические условия*

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) *Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия*

ГОСТ 29169—91 (ИСО 648—77) *Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой*

ГОСТ 25336—82 *Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры*

П р и м е ч а н и е — 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 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 Термины и определения

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением:

3.1 содержание бенз(а)пирена (benzo(a)pyrene content): Массовая концентрация бенз(а)пирена в анализируемой пробе, определенная согласно методу, установленному в настоящем стандарте.

П р и м е ч а н и е — Содержание выражается в микрограммах на килограмм.

4 Сущность метода

Анализируемую пробу растворяют в петролейном эфире и в качестве внутреннего стандарта добавляют бензо(б)хризен. Соответствующее количество пробы адсорбируют в колонке с оксидом алюминия и элюируют петролейным эфиром с целью удаления всего присутствующего бенз(а)пирена.

5 Реактивы

Используют реактивы только признанной аналитической чистоты, если не указано иначе.

5.1 Вода бидистиллированная по ГОСТ Р ИСО 52501, прошедшая фильтрацию с применением мембранного фильтра с размером пор 0,45 мкм или деионизированную воду, полученную при помощи очищающих систем деминерализации воды.

5.2 Эфир петролейный (диапазон температур кипения от 40 °С до 60 °С), или гексан, повторно дистиллированный над гранулами гидроксида калия (4 г/л).

5.3 Ацетонитрил, пригодный для ВЭЖХ.

5.4 Тетрагидрофуран, пригодный для ВЭЖХ.

5.5 Смесь ацетонитрил-тетрагидрофурана, приготовленная по 6.1.

5.6 Толуол, пригодный для ВЭЖХ.

5.7 Натрия сульфат, гранулированный, безводный.

5.8 Оксид алюминия степени активности 4, приготовленный по 6.2.

5.9 Бенз(а)пирен чистоты 99,0 % по массе.

5.9.1 Базовый раствор бенз(а)пирена в толуоле, 0,5 мг/см³, приготовленный по 6.3.

5.9.2 Растворы стандартные бенз(а)пирена, приготовленные по 6.4.

5.10 Раствор бензо(б)хризена в ацетонитриле внутренний стандартный, приготовленный по 6.5. Допускается применение других реактивов, по качеству не хуже вышеуказанных, в этом случае следует провести полный холостой анализ и привести результаты этого анализа.

6 Подготовка к измерению

6.1 Приготовление смеси ацетонитрил-тетрагидрофурана

В стакане по ГОСТ 25336 смешивают 90 см³ ацетонитрила (5.3) и 10 см³ тетрагидрофурана (5.4).

6.2 Приготовление оксида алюминия степени активности 4

Реактив готовят из нейтрального оксида алюминия, деактивированного добавлением 10 см³ воды (5.1) к 90 г оксида алюминия (5.8).

По причине различий в активности оксида алюминия различных марок проводят проверку с целью подтверждения, что процедура деактивации подходит для полного извлечения бенз(а)пирена из эталонной пробы.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — реакция деактивации экзотермическая и возможен рост давления.

Емкость встряхивают в течение примерно 15 мин и дают содержимому прийти в равновесное состояние в течение 24 ч. Оксид алюминия хранят в закрытом сосуде при комнатной температуре.

6.3 Подготовка базового раствора бенз(а)пирена в толуоле массовой концентрации 0,5 мг/см³

Взвешивают с точностью до 0,1 мг около 12,5 мг бенз(а)пирена в мерной колбе по ГОСТ 1770 вместимостью 25 см³. Растворяют его в толуоле (5.6) и доводят объем раствора толуолом до метки.

Раствор хранят в темном месте при температуре 4 °С не более 6 мес.

6.4 Приготовление стандартных растворов бенз(а)пирена

Из базового раствора бенз(а)пирена массовой концентрации 0,5 мг/см³ готовят два стандартных раствора с массовой концентрацией бенз(а)пирена приблизительно 0,2 мкг/см³ и 0,01 мкг/см³ разбавлением аликвот ацетонитрилом.

6.5 Приготовление внутреннего стандартного раствора бензо(b)хризена в ацетонитриле

Готовят базовый раствор, содержащий с точностью до нанограмма приблизительно 10 нг/мкл вещества. Данный раствор разбавляют в 10 раз в мерной колбе для получения внутреннего стандартного раствора с концентрацией примерно 1 нг/мкл.

Примечание — Данный раствор можно также приготовить растворением бензо(b)хризена 99,0 % по массе в ацетонитриле.

7 Средства измерения и оборудование

Используют обычную лабораторную аппаратуру и, в частности, следующую:

7.1 Колонку стеклянную для хроматографии длиной 300 мм и внутренним размером диаметра 15 мм, оснащенную припаянными стеклянными дисками и краном из политетрафторэтилена (ПТФЭ).

7.2 Бани водяные любого типа, обеспечивающие температуру нагрева $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$ и $(65 \pm 2)^\circ\text{C}$.

7.3 Допускается использовать испаритель мгновенного вскипания — ротационный испаритель с созданием вакуума и бани водяной, установленной на температуру 40°C . Необходимо принимать меры для предотвращения перекрестной контаминации. В периоды между определениями систему подвергают тщательной очистке.

7.4 Хроматограф жидкостный высокоэффективный, состоящий из насоса ВЭЖХ, инжекционного клапана с замкнутым контуром для пробы на 50 мкл, колонки с обращенной фазой, электронного интегратора и регистрирующего устройства.

Если используют автодозатор, замкнутый контур для пробы между последовательными инъекциями необходимо промывать ацетонитрилом.

7.5 Колонки для анализа ВЭЖХ

7.5.1 Колонка защитная с обращенной фазой, способная отделить бенз[a]пирен от совместно экстрагируемых веществ, вместе с подходящей предколонкой (например, предколонка из нержавеющей стали длиной 75 мм и внутренним размером диаметра 4,6 мм, заполненная Lichrosorb RP-18 (размер частиц 5 мкм)).

7.5.2 Колонка с обращенной фазой для ВЭЖХ длиной 250 мм и внутренним размером диаметра 4,6 мм (нержавеющая сталь) для полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) (например, Chromspher 5 PAH или Vydac 201 TP5).

7.6 Детектор флуоресценции с длиной волны испускания 460 нм (щель 10 нм) и длиной волны возбуждения 384 нм (щель 10 нм). Детектор должен обладать требуемой производительностью для проведения анализа.

7.7 Пузырьки малого объема с суженным верхом (объемом примерно 1 мл), с прокладками со слоем ПТФЭ и алюминиевыми крышками.

7.8 Устройство ручное для обжима и насадки крышек на пузырьки.

7.9 Пипетки одноразовые.

7.10 Колбы мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 25 см³.

7.11 Пипетки по ГОСТ 29169 вместимостью 1 и 5 см³, снабженные безопасным устройством для отсасывания.

7.12 Микрошприцы для хроматографии, обеспечивающие полное заполнение петли инжектора.

8 Отбор проб

Отбор проб — по ГОСТ Р 52062.

В лабораторию следует поставлять представительную пробу, которая не должна подвергаться порче или изменению во время транспортирования или хранения.

9 Подготовка пробы для определения

Подготовка проб — по [1].

10 Проведение определения

10.1 Проба для анализа — приготовление испытуемого раствора

10.1.1 Взвешивают с точностью до 0,001 г около 0,400 г *пробы продукта* в стеклянном лабораторном стакане по ГОСТ 25336 и растворяют в 2 см³ петролейного эфира (5.2). Добавляют 20 мкл внутреннего стандартного раствора (5.10) при помощи микрошприца. Это эквивалентно 50 мкг/кг при пересчете на массу пробы. Если ожидается высокий уровень бенз(а)пирена, добавляют 50 мкл внутреннего стандартного раствора (5.10). Это эквивалентно 125 мкг/кг при пересчете на массу пробы.

10.1.2 Хроматографическую колонку (7.1) заполняют на половину ее высоты петролейным эфиром (5.2). Незамедлительно взвешивают 22 г оксида алюминия (5.8) в химическом стакане по ГОСТ 25336 *емкостью 50 см³* и тут же переносят в колонку, после чего осторожно встряхивают колонку для усиления эффекта седиментации оксида алюминия.

10.1.3 Добавляют безводный сульфат натрия (5.7) к верхней части колонки для образования слоя толщиной 30 мм.

10.1.4 Открывают кран и дают петролейному эфиру стечь до уровня верха слоя сульфата натрия.

10.1.5 Под колонкой помещают мерную колбу на 20 см³.

10.1.6 Вводят раствор масла (10.1.1) в колонку. Промывают колонку минимальным количеством петролейного эфира (5.2), давая слою растворителя пройти сквозь слой сульфата натрия в период между промывками.

10.1.7 Элюируют колонку с использованием петролейного эфира со скоростью потока приблизительно 1 мл/мин, удаляя первые 20 см³ элюата и собирая последующие 60 см³ элюата в круглодонную колбу объемом 100 см³.

10.1.8 Выпаривают растворитель из элюата на водяной бане, установленной на 65 °С, до объема приблизительно от 0,5 см³ до 1,0 см³ и переносят концентрированный раствор в пузырек малого объема с суженным верхом (7.7), предварительно взвешенный с точностью 0,1 мг.

10.1.9 Продолжают выпаривание из пузырька на водяной бане (5.1), установленной на температуру 35 °С, в слабом токе азота (около 25 см³/мин) до практически сухого состояния. Споласкивают круглодонную колбу 1 см³ петролейного эфира и количественно переносят промывочный раствор в пузырек, продолжая выпаривание в атмосфере азота. *Процедуру ополаскивания повторяют со свежей порцией петролейного эфира и количественно переносят промывочный раствор в пузырек.*

Примечание — В 10.1.9 приводится уточнение процедуры выпаривания в целях более точного сбора элюата.

10.1.10 Продолжают выпаривание при температуре 35 °С в токе азота до сухого остатка.

10.1.11 Пузырек взвешивают с точностью до 0,1 мг и рассчитывают массу остатка. Укупоривают пузырек прокладкой из ПТФЭ и алюминиевой крышкой и хранят при температуре 4 °С.

10.2 Высокорастворяющая жидкостная хроматография

10.2.1 Используют смесь из 880 см³ ацетонитрила (5.3) и 120 см³ воды (5.1) в качестве растворителя для элюирования. Дегазируют растворитель для элюирования с целью устранения кислорода во избежание гашения флуоресценции. Используют продувку гелием или подключенную установку вакуумной дегазации.

10.2.2 Элюируют со скоростью потока около 1 мл/мин.

10.2.3 Калибровочная кривая и определение относительного коэффициента чувствительности детектора

Готовят 5 разбавлений стандартного раствора бенз(а)пирена (5.9.2), таких чтобы инъекция 50 мкл каждого из них давала результаты, соответствующие 0,01 нг; 0,04 нг; 0,2 нг; 1,0 нг и 2,0 нг бенз(а)пирена. К стандартным растворам добавляют 0,5 нг внутреннего стандартного раствора. На основе данных растворов строят калибровочную кривую из пяти точек, используя площади пиков, полученные интегратором и регистрирующим устройством. Данную калибровку также используют для расчета относительного коэффициента чувствительности детектора (10.1) между бенз(а)пиреном и внутренним стандартным раствором.

10.3 Анализ проб

10.3.1 Инжектируют 250 мкл смеси ацетонитрил-тетрагидрофуран (5.5) в пузырек, содержащий очищенный остаток (10.1.11). Растворяют остаток путем осторожных круговых движений, избегая контакта растворителя с прокладкой.

Используя калибровочную кривую (10.2.3), определяют уровни бенз[а]пирена от 0,1 мкг/кг до 50 мкг/кг.

В случае концентраций больше 10 мкг/кг раствор остатка (10.3.2) разбавляют далее смесью ацетонитрил-тетрагидрофуран (5.5) или инжигируют меньший объем, чем 50 мкл (10.3.2).

10.3.2 Инжигируют точно известный объем, примерно 50 мкл растворенного остатка, в колонку для ВЭЖХ и начинают процесс хроматографии.

Необходимо принять меры, чтобы гарантировать введение не более 1,5 мг остатка в колонку. Если присутствует большее количество остатка, необходимо отрегулировать количество тетрагидрофурана (5.4) или повторить стадию очистки.

11 Обработка результатов

11.1 Расчет относительных коэффициентов чувствительности

На основе полученных данных (10.2.3) рассчитывают относительный коэффициент чувствительности $f_{\text{г}}$ в качестве среднего арифметического значения пяти стандартных растворов с использованием уравнения:

$$f_{\text{г}} = \frac{A_{\text{в}} \rho_{\text{в}}}{A_{\text{с}} \rho_{\text{с}}}, \quad (1)$$

где $A_{\text{в}}$ — площадь пика внутреннего стандартного раствора;

$\rho_{\text{в}}$ — концентрация бенз(а)пирена, микрограмм на литр;

$A_{\text{с}}$ — площадь пика бенз(а)пирена;

$\rho_{\text{с}}$ — концентрация внутреннего стандартного раствора, микрограмм на литр.

11.2 Расчет содержания бенз(а)пирена

Содержание бенз(а)пирена $W_{\text{в}}$, мкг/кг, в анализируемой пробе рассчитывают с использованием уравнения:

$$W_{\text{в}} = \frac{A_{\text{в}}}{A_{\text{с}}} \rho_{\text{с}} \frac{1}{m} f_{\text{г}}, \quad (2)$$

где m — масса анализируемой пробы, г;

$f_{\text{г}}$ — средний коэффициент чувствительности, рассчитанный на основе стандартных растворов (11.1).

Содержание бенз[а]пирена выражается в качестве фракции массы в микрограммах на килограмм с точностью до одного десятичного знака для содержания от 0 мкг/кг до 10 мкг/кг и до ближайшего целого числа — для содержания, превышающего 10 мкг/кг.

12 Точность

12.1 Повторяемость

Абсолютная разница между двумя независимыми отдельными результатами испытаний, полученными с использованием одного и того же метода, применительно к идентичному испытываемому материалу, в той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в течение короткого периода времени, должна не более чем в 5 % случаев превышать предел сходимости r , приведенный в приложении А (таблица А.1).

12.2 Воспроизводимость

Абсолютная разница между двумя независимыми отдельными результатами испытаний, полученными с использованием одного и того же метода, применительно к идентичному испытываемому материалу, в различных лабораториях, различными операторами, с использованием различного оборудования, должна не более чем в 5 % случаев превышать предел воспроизводимости R , приведенный в приложении А (таблица А.1).

Приложение А
(справочное)

Результаты межлабораторных испытаний

В 16 лабораториях из 7 стран были осуществлены международные совместные испытания трех образцов с различным содержанием бенз(а)пирена (низким, средним и высоким). Результаты пяти лабораторий не были приняты во внимание, т. к. они были основаны не на протоколе метода, а на собственных внутренних методах.

Испытания были организованы в 2006 г. комитетом-членом (Голландия), полученные результаты прошли статистический анализ в соответствии с ИСО 5725-2[2] с целью получения данных относительно точности, приведенных в таблице А.1.

Т а б л и ц а А.1 — Результаты межлабораторных испытаний

Наименование показателя	Содержание бенз(а)пирена		
	низкое	среднее	высокое
Число участвующих лабораторий	11	11	11
Число лабораторий после исключения лабораторий с резко отклоняющимися значениями	9	9	9
Число результатов испытаний, поступивших от оставшихся лабораторий	18	18	18
Среднее значение, мкг/кг	2,12	38,02	58,30
Стандартное отклонение сходимости s_r , мкг/кг	0,12	0,76	2,04
Коэффициент вариации сходимости $CV(r)$, %	5,8	2,0	3,5
Предел сходимости r ($= 2,8s_r$), мкг/кг	0,34	2,12	5,72
Стандартное отклонение воспроизводимости, s_R , мкг/кг	0,55	6,23	8,37
Коэффициент вариации воспроизводимости, $CV(R)$, %	26,9	16,4	14,4
Предел воспроизводимости R ($= 2,8s_R$), мкг/кг	1,54	17,44	23,4

Приложение Б
(справочное)

**Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой
примененного в нем международного стандарта**

Таблица Б.1

Структура ИСО 15302:2007	Структура настоящего стандарта
1 Область применения	1 Область применения
2 Нормативные ссылки	2 Нормативные ссылки
3 Термины и определения	3 Термины и определения
4 Принцип	4 Сущность метода
5 Реагенты	5 Реактивы
—	6 Подготовка к измерению
6 Оборудование	7 Средства измерения и оборудование
7 Отбор проб	8 Отбор проб
8 Приготовление испытуемой пробы	9 Подготовка пробы для определения
9 Порядок работы	10 Проведение определения
10 Выражение результатов	11 Обработка результатов
11 Точность	12 Точность
12 Отчет об испытаниях	—
Приложение А (информационное) Результаты межлабораторных испытаний	Приложение А (справочное) Результаты межлабораторных испытаний
—	Приложение Б (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного стандарта
—	Библиография

Библиография

- [1] ИСО 661:2003 *Жиры и масла животные и растительные. Подготовка пробы для испытания*
- [2] ИСО 5725-2:1994/Cor.1:2002 *Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения*

УДК 636.087.07:006.354

ОКС 67.200.10

H59

ОКСТУ 9109

Ключевые слова: Жиры и масла животные и растительные, содержание бенз(а)пирена, термины и определения, сущность метода, реактивы, подготовка к определению, средства измерения и оборудование, проба для анализа, проведение определения, высокоразрешающая жидкостная хроматография, обработка результатов

Редактор *М.Е. Никулина*
 Технический редактор *В.Н. Прусакова*
 Корректор *В.И. Варенцова*
 Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 09.09.2011. Подписано в печать 02.11.2011. Формат 60 × 84 $\frac{1}{8}$. Гарнитура Ариал.
 Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 0,75. Тираж 191 экз. Зак. 1054.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru

Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.

Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.