

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**КОРМА, КОМБИКОРМА,
КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ**

Метод определения массовой доли зеараленона

Издание официальное

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
© Стандартиформ, 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

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, уксуса 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 двумерной 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 бензина.

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/дм³;

раствор уксуснокислого свинца готовят следующим образом:

200 г уксуснокислого свинца помещают в мерную колбу с одной отметкой вместимостью 1000 см³, добавляют 3 см³ уксусной кислоты, доводят водой до метки и перемешивают;

бисдиазотированный бензидиновый реактив.

Приготовление раствора бензидина массовой концентрации 5 г/дм³.

В мерную колбу вместимостью 100 см³ приливают 20 см³ воды, 1,5 см³ 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/дм³ 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/см³.

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/см³, рассчитывают по формуле

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

где 318 — молярная масса зеараленона, г/моль;

6060 — коэффициент молярной экстинкции, дм³/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 см³ 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 см³;
 флуоресцентометр (при наличии);
 баню водяную температурой 60 °С;
 колбы конические с притертой пробкой вместимостью 500 см³;
 воронки делительные вместимостью 250 см³;
 цилиндры мерные вместимостью 100 и 250 см³;
 пипетки вместимостью 50 и 100 см³;
 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 см³ ацетонитрила и 20 см³ 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 см³ фильтрата переливают пипеткой в делительную воронку, где фильтрат двукратно обезжиривают изоктаном по 50 см³ каждый раз.

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

7.4 Очистка

К полученному остатку приливают 20 см³ ацетонитрила, 60 см³ воды и 20 см³ 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 см³ фильтрата отбирают пипеткой в делительную воронку и проводят тройную переэкстракцию хлороформом по 50 см³ 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 см³ 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.

- А — 25 мкдм³ очищенного экстракта.
- В — 10 мкдм³ стандартного раствора.
- С — 5 мкдм³ стандартного раствора.
- D — 10 мкдм³ стандартного раствора.
- E — 15 мкдм³ стандартного раствора.

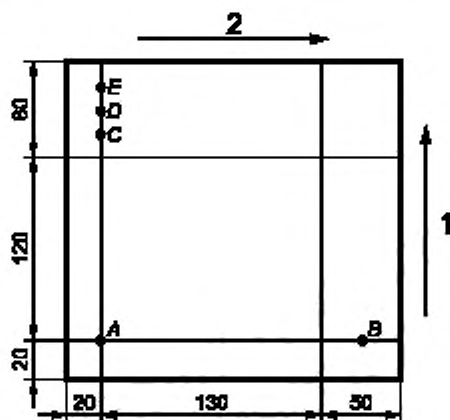


Рисунок 1 — Нанесение растворов и проявление хроматограммы

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 В 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 мкдм³ превышает интенсивность свечения пятна стандартного раствора зеараленона объемом 15 мкдм³, 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

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

где c — массовая концентрация зеараленона в стандартном растворе, мкг/см³;

V_1 — конечный объем экстракта с учетом возможных разбавлений, мкдм³;
 V_3, V_2 — объемы стандартного раствора зеараленона и экстракта соответственно, с одинаковой интенсивностью флуоресценции, мкдм³;
 m — масса исследуемой пробы, соответствующая объему экстракта, подвергнутого очистке, г (12.5).

8.2 Флуоресциметрическое 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, мкдм³;
 m — масса исследуемой пробы, соответствующая объему экстракта, подвергнутого очистке, г (12.5);
 V_2 — объем экстракта, наносимого на пластину, мкдм³ (25 мкдм³).

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.

Т а б л и ц а 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_p	78	34
Коэффициент отклонения повторяемости	11 %	15 %
Повторяемость $2,83 S_p$	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. Конопенко*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Подписано в печать 29.09.2005. Формат 60×84¹/₈. 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.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru
Набрано в Издательстве на ПЭВМ
Отпечатано во ФГУП «Стандартинформ»