
Жиры и масла животные и растительные. Определение содержания бензо[а]пирена. Метод с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с обратной фазой

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Animal and vegetable fats and oils — Determination of benzo[a]pyrene — Reverse-phase high performance liquid chromatography method

[ISO 15302:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-f207adcc07de/iso-15302-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-f207adcc07de/iso-15302-2007>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R (Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочный номер
ISO 15302:2007(R)

Отказ от ответственности при работе в PDF

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или вывести на экран, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на загрузку интегрированных шрифтов в компьютер, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 15302:2007

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-f207adcc07de/iso-15302-2007>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2007

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO по соответствующему адресу, указанному ниже, или комитета-члена ISO в стране заявителя.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. ISO осуществляет тесное сотрудничество с международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Проекты международных стандартов разрабатываются по правилам, указанным в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Главная задача технических комитетов состоит в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения, по меньшей мере, 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Обращается внимание на возможность патентования некоторых элементов данного международного стандарта. ISO не несет ответственности за идентификацию какого-либо или всех таких патентных прав.

ISO 15302 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 11, *Жиры и масла животные и растительные*.

Это второе издание отменяет и заменяет первое издание (ISO 15302:1998).

Жиры и масла животные и растительные. Определение содержания бензо[а]пирена. Метод с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с обратной фазой

1 Область применения

Настоящий международный стандарт устанавливает метод для определения бензо[а]пирена в сырых или очищенных пищевых маслах и жирах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с обратной фазой (HPLC) с использованием люминесцентного детектирования в диапазоне от 1 мкг/кг до 50 мкг/кг.

2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные нормативные документы являются обязательными при применении данного документа. Для жестких ссылок применяется только цитированное издание документа. Для плавающих ссылок необходимо использовать самое последнее издание нормативного ссылочного документа (включая любые изменения).

ISO 661, *Жиры и масла животные и растительные. Подготовка пробы для испытания*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-f207adcc07de/iso-15302-2007>

3 Термины и определения

Применительно к этому документу используются следующие термины и определения.

3.1

содержание бензо[а]пирена

benzo[a]pyrene content

массовая доля бензо[а]пирена в испытательном образце, определенная с использованием метода, установленного в этом международном стандарте

ПРИМЕЧАНИЕ Это содержание выражается в микрограммах на килограмм.

4 Принцип

Испытательный образец растворяют в петролейном эфире и добавляют бензо[б]хризен в качестве внутреннего эталона. Подходящее количество пробы адсорбируют на колонке с оксидом алюминия и элюируют посредством петролейного эфира для удаления присутствующего бензо[а]пирена.

5 Реактивы

Использовать реактивы только признанной аналитической чистоты, если не установлено иначе. Если используются аналитические растворители, которые здесь не рекомендованы, то проводится полный холостой анализ и его результаты публикуются.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ. Обращается внимание на регламент, который устанавливает процедуры обращения с опасными веществами. Пользователи должны понимать и соблюдать технические, организационные и личные меры безопасности.

5.1 Вода, двукратно дистиллированная, отфильтрованная через фильтр с размером пор 45 мкм; можно также использовать деионизированную воду, полученную путем очистки деминерализованных водных систем.

5.2 Петролейный эфир (интервал температуры кипения от 40 °С до 60 °С), или **гексан**, повторно дистиллированный через гранулы гидроксида калия (4 г/л).

5.3 Ацетонитрил, подходящий для высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).

5.4 Тетрагидрофуран, подходящий для HPLC.

5.5 Смесь ацетонитрила-тетрагидрофурана, приготовленная путем смешивания 90 мл ацетонитрила (5.3) и 10 мл тетрагидрофурана (5.4).

5.6 Тoluол, подходящий для HPLC.

5.7 Сульфат натрия, гранулированный, безводный.

5.8 Оксид алюминия с активностью класса 4, приготовленный из нейтрального оксида алюминия с высоким классом активности (1¹), дезактивированный путем добавления 10 мл воды (5.1) к 90 г оксида алюминия.

Из-за различия в активности различных марок оксида алюминия рекомендуется проверка для подтверждения, что процедура дезактивации является подходящей для полного выделения бензо[а]пирена из эталонного образца.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ. РЕАКЦИЯ ДЕЗАКТИВАЦИИ ЯВЛЯЕТСЯ ЭКЗОТЕРМИЧЕСКОЙ, И ДАВЛЕНИЕ МОЖЕТ РАСТИ.

Встряхивать контейнер в течение 15 мин и оставить на 24 ч для приведения содержимого в равновесие. Хранить оксид алюминия в закрытом резервуаре при температуре окружающей среды.

5.9 Бензо[а]пирен², чистотой 99,0 % по массе.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ – БЕНЗО[а]ПИРЕН ЯВЛЯЕТСЯ ИЗВЕСТНЫМ КАНЦЕРОГЕНОМ. ВСЮ РАБОТУ ВЫПОЛНЯЙТЕ В ВЫТЯЖНОМ ШКАФУ И НАДЕВАЙТЕ ПЕРЧАТКИ, ЧТОБЫ МИНИМИЗИРОВАТЬ ВОЗДЕЙСТВИЕ.

5.9.1 Исходный раствор бензо[а]пирена в толуоле, 0,5 мг/мл.

Отвесить с точностью до 0,1 мг около 12,5 мг бензо[а]пирена в 25-мл мерную колбу. Растворить его в толуоле (5.6) и довести до метки этим растворителем.

Хранить раствор в темноте при 4 °С, где он будет устойчив как минимум 6 месяцев.

1) "Оксид алюминия 90 активный нейтральный" является примером подходящего продукта, имеющегося в продаже. Эта информация дается для удобства пользователей данного международного стандарта и не является поддержкой этого продукта со стороны ISO. Можно использовать аналогичные продукты, если есть данные, что они дают такие же результаты.

2) Подходящий стандартный образец имеется в центре Joint Research Centre of the European Commission, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM). Эта информация дается только для удобства пользователей данного международного стандарта и не является поддержкой этого продукта со стороны ISO

5.9.2 Стандартные растворы бензо[а]пирена.

Приготовить два стандартных раствора, содержащих приблизительно 0,2 мкг/мл и 0,01 мкг/мл бензо[а]пирена соответственно, разбавляя аликвоты исходного раствора (5.9.1) ацетонитрилом.

5.10 Внутренний стандартный раствор бензо[б]хризена³⁾ в ацетонитриле.

Приготовить исходный раствор, содержащий с точностью до наногрaмм около 10 нг/мл. Разбавить этот раствор до увеличения в 10 раз в мерной колбе, чтобы получить внутренний стандартный раствор с концентрацией приблизительно 1 нг/мл.

ПРИМЕЧАНИЕ. Этот раствор можно также приготовить, растворяя бензо[б]хризен³⁾, 99,0 % по массе, в ацетонитриле.

6 Оборудование

Используется обычное лабораторное оборудование, в частности следующее.

6.1 Стеклянная колонка для хроматографического анализа длиной 300 мм и внутренним диаметром 15 мм, оснащенная дисками из пористого стекла и политетрафторэтиленовой (PTFE) крышкой.

6.2 Водяные бани, одна, поддерживаемая при $(35 \pm 2) ^\circ\text{C}$, и другая при $(65 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

6.3 Мгновенный испаритель, можно использовать роторный испаритель с вакуумом и водяной баней, установленный на $40 ^\circ\text{C}$. Принимать меры для предотвращения перекрестного загрязнения. Полностью очищать систему между измерениями.

6.4 Высокоэффективный жидкостный хроматограф, состоящий из HPLC насоса, инжекционного клапана с 50-мкл пробоотборной петлей, обратнофазной колонки, электронного интегратора и диаграммного самописца.

Если используется автоматический пробоотборник, пробоотборную петлю нужно промывать ацетонитрилом между последовательными инъекциями.

6.5 Колонки для HPLC анализа

6.5.1 Обратнофазная защитная колонка, обеспечивающая растворение бензо[а]пирена из совместных экстрактивных веществ, вместе с подходящей предколонкой [например, предколонка из нержавеющей стали длиной 75 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, наполненная Lichrosorb RP-18 (размер частиц 5 мкм)]⁴⁾.

6.5.2 HPLC обратнофазная колонка длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм (нержавеющая сталь) для полициклических ароматических углеводородов (PAHs) [например, Chromspher 5 PAH или Vydac 201 TP5]⁴⁾.

6.6 Люминесцентный детектор с длиной волны излучения 406 нм (щель 10 нм) и длиной волны возбуждения 384 нм (щель 10 нм). Рабочие характеристики детектора должны обеспечивать проведение анализа.

3) Подходящий стандартный образец имеется в центре Joint Research Centre of the European Commission, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) или у Dr. Ehrenstorfer GmbH. Эта информация дается для удобства пользователей данного международного стандарта и не является поддержкой этого продукта со стороны ISO.

4) Указанные подходящие продукты имеются в продаже. Эта информация дается для удобства пользователей данного международного стандарта и не является поддержкой этого продукта со стороны ISO. Можно использовать аналогичные продукты, если есть данные, что они дают такие же результаты.

6.7 Минипробирки с обжимным верхом объемом около 1 мл, с PTFE-слоистыми мембранами для ввода пробы и с алюминиевыми крышками.

6.8 Ручные обжимные щипцы для закупоривания пробирок крышками.

6.9 Одноразовые пипетки.

7 Отбор проб

В лабораторию должна быть отправлена представительная проба. Повреждения или изменения во время транспортировки или хранения не допустимы.

Отбор проб не является частью метода, установленного в этом международном стандарте. Рекомендованный метод отбора проб дан в ISO 5555^[1].

8 Приготовление испытательного образца

Приготовить испытательный образец согласно ISO 661.

9 Процедура

9.1 Очистка пробы

9.1.1 Отвесить с точностью до 0,001 г около 0,400 г жира или масла в стеклянную мензурку и растворить в 2 мл петролейного эфира (5.2). Добавить 20 мкл внутреннего стандартного раствора (5.10) с помощью микрошприца. Это эквивалентно 50 мкг/кг при вычислении по массе пробы. Если ожидается более высокий уровень бензо[а]пирена, нужно добавить 50 мкл внутреннего стандартного раствора (5.10). Это эквивалентно 125 мкг/кг при вычислении по массе пробы.

9.1.2 Наполнить хроматографическую колонку (6.1) до половины высоты петролейным эфиром (5.2). Быстро отвесить 22 г оксида алюминия (5.8) в небольшую мензурку и сразу перенести этот оксид алюминия в колонку, затем мягко постукивая по колонке, вызвать осаждение оксида алюминия.

9.1.3 Добавить безводный сульфат натрия (5.7) в верхнюю часть колонки, чтобы образовать слой высотой 30 мм.

9.1.4 Открыть пробку, чтобы петролейный эфир опустился до уровня слоя сульфата натрия.

9.1.5 Поместить 20-мл мерную колбу под колонку.

9.1.6 Ввести раствор масла (9.1.1) на колонку. Промывать колонку минимальными количествами петролейного эфира (5.2), позволяя слою растворителя проникать в слой сульфата натрия между промывками.

9.1.7 Элюировать колонку петролейным эфиром при скорости течения 1 мл/мин, отбрасывая первые 20 мл элюата и собирая следующие 60 мл в 100-мл круглодонную колбу.

9.1.8 Выпарить растворитель из элюата в водяной бане 65 °C до объема от 0,5 мл до 1,0 мл и перенести концентрированный раствор в минипробирку с обжимным верхом (6.7), предварительно взвешенную с точностью до 0,1 мг.

9.1.9 Продолжать выпаривание из минипробирки в водяной бане (5.1), установленной на 35 °C, под слабым потоком азота (около 25 мл/мин) почти до полной сухости. Промыть круглодонную колбу, используя около 1 мл петролейного эфира, и перенести количественно остатки промывки в минипробирку, продолжая выпаривание под азотом. Еще раз повторить промывку и перенос в минипробирку.

9.1.10 Продолжать выпаривание при 35 °С под азотом до сухости.

9.1.11 Взвесить минипробирку с точностью до 0,1 мг и вычислить массу осадка. Закупорить минипробирку PTFE-слоистой мембраной и алюминиевой крышкой и хранить при 4 °С.

9.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография

9.2.1 Использовать смесь из 880 мл ацетонитрила (5.3) и 120 мл воды (5.1) в качестве элюента. Дегазировать элюент, чтобы удалить кислород для избежания люминесцентного ослабления. Использовать гелиевую продувку или встроенный вакуумный дегазатор.

9.2.2 Элюировать при скорости потока около 1 мл/мин.

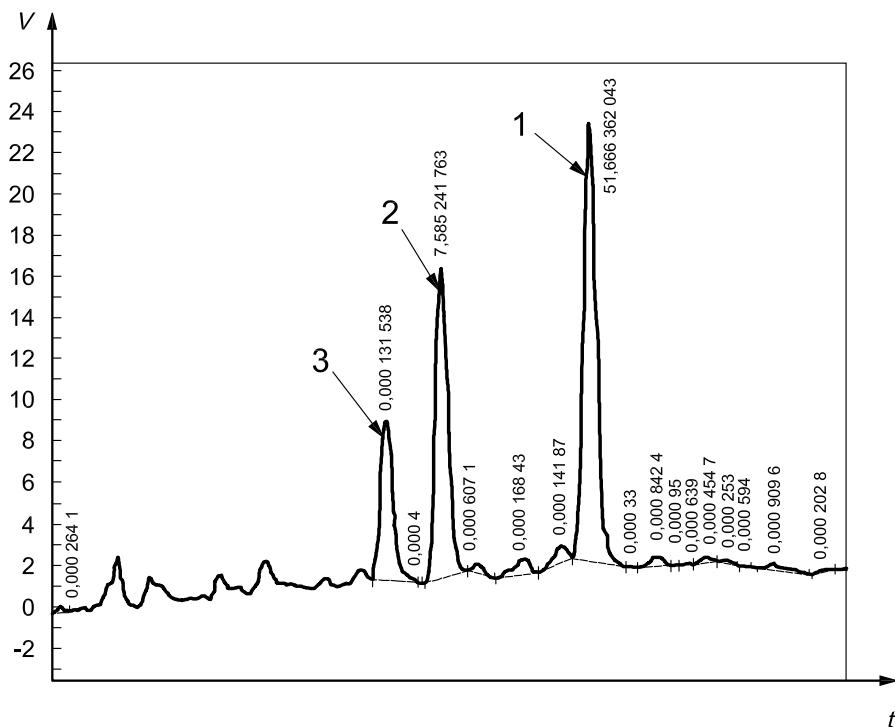
9.2.3 Калибровочная кривая и определение относительного фактора отклика: Приготовить пять разбавлений стандартных растворов бензо[а]пирена (5.9.2) таким образом, чтобы инъекция 50 мкл каждого дала показания, соответствующие 0,01 нг, 0,04 нг, 0,2 нг, 1,0 нг и 2,0 нг бензо[а]пирена. Добавить к стандартным растворам 0,5 нг внутреннего стандартного раствора. По этим данным построить пятиточечную калибровочную кривую, используя области пиков из интегратора и диаграммного самописца. Эти калибровки также используются, чтобы вычислить относительный фактор отклика (10.1) между бензо[а]пиреном и внутренним стандартом.

9.3 Анализ образца

9.3.1 Инжектировать 250 мкл смеси ацетонитрила-тетрагидрофурана (5.5) в минимензурку, содержащую очищенный осадок (9.1.11). Растворить осадок, осторожно вращая минимензурку, чтобы избежать контактирования растворителя с мембраной.

По калибровочной кривой (9.2.3) можно определить уровни бензо[а]пирена от 0,1 мкг/кг до 50 мкг/кг. Для концентраций выше 10 мкг/кг осадочный раствор (9.3.2) следует разбавлять далее смесью ацетонитрила-тетрагидрофурана (5.5) или нужно инжектировать объем меньше 50 мкл (9.3.2).

9.3.2 Инжектировать точно известный объем растворенного осадка, около 50 мкл, в HPLC колонку и начать обработку хроматограммы. Следить, чтобы в колонку было введено не более 1,5 мг осадка. Если имеется больше осадка, то количество тетрагидрофурана (5.4) нужно соответственно отрегулировать или повторить этап очистки.



Обозначения

- V HPLC поглотительность/мВ
 t время/мин
 1 бензо[*b*]хризен (внутренний стандарт)
 2 бензо[*a*]пирен
 3 бензо[*k*]флуорантен

iteh STANDARD PREVIEW
 (standards.iteh.ai)

ISO 15302:2007

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/204574a3-4666-4b68-9e7b-1207adcc07de/iso-15302-2007>

Рисунок 1 – Типичная хроматограмма

10 Выражение результатов

10.1 Вычисление относительных факторов отклика

Из полученных данных (9.2.3) вычислить относительный фактор, $f_{гр}$, как среднее арифметическое пяти стандартных растворов, используя уравнение (1):

$$f_{гр} = \frac{A_{is} \rho_{BaP}}{A_{BaP} \rho_{is}} \quad (1)$$

где:

A_{BaP} область пиков бенз[*a*]пирена;

A_{is} область пиков внутреннего стандартного раствора;

ρ_{BaP} концентрация, в микрограммах на литр, бенз[*a*]пирена;

ρ_{is} концентрация, в микрограммах на литр, внутреннего стандартного раствора.

10.2 Вычисление содержания бензо[*a*]пирена

Вычислить содержание бензо[*a*]пирена, w_{BaP} , в микрограммах на килограмм, испытательного образца,