ГОСУДАРСТВЕННОЕ
САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ НОРМИРОВАНИЕ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СБОРНИК

МЕТОДИЧЕСКИХ ДОКУМЕНТОВ, НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕДЕРАЛЬНОГО ЗАКОНА ОТ 12.06.08 №88-ФЗ

«Технический регламент на молоко и молочную продукцию»

Часть 14

МОСКВА 2010

gost.e-ecolog.ru

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

Сборник методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию»

Часть 14

ББК 51.23
С23

С23 **Сборник** методических документов, необходимых для обеспечения применения Федерального закона от 12 июня 2008 г. № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию».—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.—76 с.

ISBN 5—7508—0771—1

В сборник включены методические документы, содержащие правила и методы исследований (испытаний) и измерений, а также правила отбора образцов для проведения исследований (испытаний) и измерений, в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации Г. Г. Онищенко от 08.12.2008 № 67.

Настоящие «Методические указания» предназначены санитарно-эпидемиологических станций Минздрава СССР, а также ветеринарных, агрохимических, контрольно-токсикологических лабораторий Минсельхоза СССР к лабораторий других министерств и ведомств занижающихся анализом остаточных количеств пестицидов и биопрепаратов в продуктах питания, кормах и внешней среде.

«Методические указания» подготовлены Главным санитарно-эпидемиологическим управлением Министерства здравоохранения СССР, Государственной комиссией по химическим средствам борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками при Министерстве сельского хозяйства СССР, Всесоюзным научно-исследовательским институтом гигиены и токсикологии пестицидов (лаборатория аналитической химии пестицидов и лаборатория кибернетических исследований пестицидов в окружающей среде), Всесоюзным научно-исследовательским институтом химических средств защиты растений (сектор анализа пестицидов).

ББК 51.23

Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 18.02.10

Формат 60x88/16 Печ. л. 4,75

Тираж 200 экз. Заказ 14

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

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

© Роспотребнадзор, 2010
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010

Содержание

Методические указании по определению сульфидоюса в мясе, молоке и кормах методом тонкослойной хроматографии....4

Нормативы и методы микробиологического контроля продуктов детского питания, изготовленных на молочных кухнях системы здравоохранения....16

Методические указания по выделению, идентификации и количественному определению насыщенных, моно-, би-, три- и ряда полициклических ароматических углеводородов в пищевых продуктах: № 4721—88....23

Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания деэоксиниваленола (вомитоксина) и зеараленона в зерне и зернопродуктах....31

Временые методические указания по определеню митака в растительном материале, почве, воде, органах, тканях и молоке животных методами тонкослойной и газожидкостной хроматографии....45

Методические указания по обнаружению и определению содержания общей ртути в пищевых продуктах методом беспламенной атомной абсорбции....52

Атомно-абсорбционные методы определения токсичных элементов в пищевых продуктах и пищевом сырье....60

Методические указания по выделению, идентификации и количественному определению насыщенных, моно-, би-, три- и ряда полициклических ароматических углеводородов в пищевых продуктах

№ 4721—88

Часть 2. Определение полициклических ароматических углеводородов

1. Принцип метода

Методика заключается в выделении ПАУ из неомыляемой фракции липидов, получаемой при обработке образца спиртовым раствором щелочи, и экстракции гексаном путем хромагографического разделения экстракта, идентификации и количественном определении с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и спектрофлуориметрии а также визуально в тонком слое ацетилированной целлюлозы.

2. Приборы и реактивы

Колбы круглодонные вместимостью 1000, 250, 100 мл
Колбы каплевидные вместимостью 100, 50 мл
Колбы конические плоскодонные вместимостью 1000, 500, 50 мл
Холодильник обратный шариковый длиной 40 см
Аллонж вакуумный
Каплеуловитель
Воронки делительные вместимостью 1000, 500 мл
Воронки Шотта, стеклянный пористый фильтр N 1,3
Хроматографические колонки стеклянные вн. диаметр 10—15 мм, высота 500 мм со стеклянным пористым фильтром N 3
Камера храматографическая стеклянная 40 х 40 х 40 см с притертой крышкой
Пластины стеклянные 20 х 20 см
Воронка Бюхнера
Цилиндры мерные и колбы мерные вместимостью 250, 100, 50 мл
Насос водоструйный лабораторный
Испаритель ротационный типа ИР –1М
Весы технические с погрешностью взвешивания не более 0,01 г
Весы лабораторные с погрешностью взвешивания не более 0,0002 г
Печь муфельная обеспечивающая нагрев до 600 С
Магнитная мешалка

Жидкостной хроматограф с флуоресцентным детектором
колонка ODS 5 мкм, 150 мм. вн. диаметр 4 мм
Спектрофотометр флуоресцентный типа MPF – 43 А
Облучатель ультрафиолетовый с длиной волны 365 нм

калий гидроокись чда по ГОСТ 24363—76
натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4155—76
н-гексан, ч по ТУ 6-09–3375–78
хлороформ по ГОСТ 20015–74

спирт этиловый ректификат по ГОСТ 18-300–72
диметилформамид чда по ГОСТ 20289–74
бензол хч по ГОСТ 955–75
уксусный ангидрид чда
ацетонитрил осч ТУ 6-09-2157–84
вода для ВЭЖХ деионизированная на установке типа «Seradest SR – 700»
сефадекс LH – 20 «Pharmacia», Швеция
целлюлоза микрокристаллическая ацетилированная «Aldrich» – или целлюлоза микрокристаллическая «Chemapol», Чехия.
Стандарты пирен, бенз(а)антрацен, хризен, бенз(к)флуорантен, бенз(b)флуорантен, бенз(а) пирен, бенз(е) пирен, дибенз(а,h)антрацен, бенз(b)хризен, Serva. Швеция

3. Подготовка к анализу

Все растворители перегоняются общепринятым способом. Кроме того, диметилформамид перегоняют, добавив к 250 мл 30 мл бензола и 12 мл воды, собирают фракцию, выкипающую при температуре выше 153 С.

Натрий сернокислый безводный: 1 кг заливают 1 л хлороформа, оставляют на 3—4 час., фильтруют на воронке Бюхнера еще раз промывают на фильтре хлороформом и прокаливают при температуре 450—500 С в течение 6 час.

Получение ацетилированной целлюлозы.

Для ацетилирования используют микрокристаллическую целлюлозу марки «Chemapol». В плоскодонной широкогорлой колбе вместимостью 500 мл готовят смесь из 150 мл бензола или толуола, 70 мл уксусного ангидрида и 0,3 мл концентрированной серной кислоты. К приготовленной смеси добавляют 50 г целлюлозы. Реакционную смесь перемешивают на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение 24 час. По окончании реакции надосадочную жидкость декантируют, а осадок заливают 200 мл этилового спирта и оставляют на 24 час. Далее надосадочную жидкость отфильтровывают на воронке Бюхнера осадок промывают 100 мл этилового спирта и дистиллированной водой до нейтральной реакции (5 х 300 мл), сушат на воздухе.

Пластинки с ацетилированной целлюлозой: 5 г сорбента суспендируют в 20 мл этилового спирта и ровным слоем выливают на стеклянную пластинку, высушивают на воздухе.

Сефадекс LH-20: за 3—4 час. до проведения хроматографического разделения 10 г Сефадекса заливают 50 мл этилового спирта и оставляют для набухания, после чего гель переносят на колонку сохраняя верхний слой спирта 1—2 см, чтобы не допустить просыхания сорбента до нанесения разделяемого вещества.

Растворы сравнения.

Для приготовления исходных растворов берут навески не менее 20 мг с точностью до 0,2 мг, растворяют в бензоле в мерных колбах объемом 50—100 мл и хранят в холодильнике. Рабочие растворы готовят из исходных разведением в бензоле ацетонитриле.

Концентрация компонентов в рабочем растворе ПАУ для ВЭЖХ. мкг/мл ацетонитрила:

пирен – 10	бенз(а)антрацен – 10	хризен –20
бенз(е)пирен – 10	бенз(b)флуорантен-1	бенз(к)флуорантен – 1
бенз(а)пирен – 1	дибенз(а,h)антрацен – 2	

Концентрация раствора внутреннего стандарта для ВЭЖХ

Бенз(b)хризен 0,1 мкг/мл бензола

Концентрация раствора сравнения бенз(а)пирена для спектрофлуориметрического определения 20 нг/мл бензола.

4. Проведение определения

4.1. Щелочной гидролиз и экстракция

50 г измельченного продукта помещают в плоскодонную колбу вместимостью 1000 мл добавляют 19,5 г гидроокиси калия и 250 мл 92 % этилового спирта, а также вносят внутренний стандарт для ПАУ 100—200 мкл раствора бенз(b)хризена. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают при кипении реакционной смеси и перемешивании на магнитной мешалке в течение 3 час. При анализе растительных продуктов реакционную массу фильтруют на воронке Бюхнера, промывают осадок на фильтре 50 мл горячего этилового спирта. Раствор охлаждают до комнатной температуры, добавляют 350 мл дистиллированной воды, переносят в делительную воронку емкостью 1000 мл и экстрагируют трижды по 150 мл гексана для расслоения эмульсии можно добавлять в воронку небольшие количества, сульфате натрия. Экстракты объединяют промывают дистиллированной водой (3 х 50 мл) и фильтруют через слой сульфата натрия через стеклянную воронку с простым фильтром. Раствор переносят в круглодонную колбу и упаривают гексан до объема 100 мл. Упаренный раствор переносят в делительную воронку и добавляют 100 мл смеси диметилформамида и воды

взятых объемном соотношении 9 : 1. Содержимое воронки интенсивно встряхивают в течение 1 мин. нижний слой переносят в плоскодонную колбу, а из верхнего гексанового слоя еще раз экстрагируют ПАУ, добавляя в воронку 100 мл водного диметилформамида. Гексановый верхний слой отбрасывают, а объединенный диметилформамидный экстракт разбавляют 200 мл воды и экстрагируют из него ПАУ гексаном, трижды по 75 мл гаксановые экстракты объединяют и промывают водой (4 х 50 мл), переносят в плоскодонную колбу и обезвоживают, добавляя 30 г сульфата натрия в течение 1 час. Экстракт упаривают до объема 1—1,5 мл) остаток растворителя удаляют током азота или воздуха. Вещество в колбе растворяют в 1—1,5 мл этилового спирта и фракционируют на колонке с сефадексом LH-20.

4.2. Фракционирование на колонке с сефадексом LH-20.

Спиртовый раствор переносят на подготовленную колонку с сефадексом LH-20 (остаточный слой спирта над слоем сорбента должен быть около 2 мм), смывая его из колбы 2—3 раза небольшим количеством этилового спирта, каждый раз давая растворителю полностью впитаться в слой сорбента. Элюируют вещество с колонки этиловым спиртом со скоростью 0,5 мл/мин., обеспечивая такой поток небольшим избыточным давлением тока воздуха или азота подаваемого через насаду заполненную силикагелем. Первую фракцию 50 мл отбрасывают, вторую фракцию 100 мл содержащую ПАУ с числом циклов 4—7, собирают в каплевидную колбу с оттянутым дном и упаривают растворитель до небольшого объема остаток растворителя отдувают током азота или воздуха.

4.3. Выделение бенз(а)пирена из фракции ПАУ тонкослойной хроматографией на ацетилированной целлюлозе

Фракцию ПАУ растворяют в 1 мл бензола и наносят раствор сплошной полосой шириной не более 0,5 см на пластинку с ацетилированной целлюлозой, оставляя с нижнего и боковых краев пластинки поля шириной 1,5—2,0 см. На стартовую линию бокового поля, отделенного от основного с помощью скальпеля наносят в точку 1—2 мкл раствора бенз(а)пирена с концентрацией 1 мкг/мл. Пластинку помещают в хроматографическую камеру и проводят элюирование в смеси этилового спирта ацетона и воды, взятых в объемном соотношении 60 : 25 : 15.

Камера должна быть предварительно насыщена парами растворителя в течении 2—3 час. Для лучшего насыщения стенки камеры выстилают листами фильтровальной бумаги, опущенными на дно камеры.

Когда фронт растворителя достигнет 2 см от верхнего края пластинки, ее вынимают и проявляют зону бенз(а)пирена на боковом поле в УФ свете Rf бенз(а)пирена в данной системе 0,1. Сорбент из зоны основного поля пластинки, соответствующей бенз(а)пирену, собирают на воронку Шотта и элюируют вещество бензолом (5 х 5 мл) в круглодонную колбу. Растворитель упаривают до небольшого объема, остаток удаляют током азота или воздуха, а затем добавляют 1 мл бензола.

4.4. Идентификация и количественное определение ПАУ

4.4.1. Анализ методом ВЭЖХ

Фракцию ПАУ выделенную согласно п. 4.2, растворяют в 200 – 400 мкл ацетонитрила и вводят с помощью петлевого дозатора объемом 10 – 100 мкл 10—25 мкл анализируемого раствора в инжектор хроматографа.

В качестве примера могут служить следующие условия: хроматограф «Altex-334» с флуоресцентным детектором «Kratos FS 970», колонка Supelcosil LC PAH 5 мк; длиной 150 мм и вн. диаметром 4,6 мм. Детектирование при длине волны возбуждающего света 300 нм с использованием эмиссионного фильтра 418 нм. Подвижная фаза ацетонитрил: вода, взятые в объемном соотношении 8 : 2, скорость потока 2 мл/мин. Все применяемые растворители подвергают предварительной очистке на милипоровых фильтрах 47 мк.

Время анализа примерно 15 мин. время удерживания бенз(а)пирена 5 мин., бенз(b)хризена – 13 мин.

Расчет содержания компонентов смеси ПАУ (X) в образце, мкг/кг проводят по следующей формуле:

$$X = \frac{M \cdot S1}{S2} \cdot K \cdot \frac{1000}{G}, \text{ где}$$

M – количество введенного внутреннего стандарта (мкг);

S1 и *S2* – площади пиков определяемого компонента и внутреннего стандарта соответственно;

G – навеска образца, г;

K – калибровочный коэффициент определенный экспериментально для данных условий детектирования, составляет для следующих ПАУ

бенз(b)хризен	1
пирен	118,8
бенз(а)антрацен	101,1
хризен	274,0
бенз(е)пирен	106,7

бенз(b)флуорантен 12,2
бенз(к)флуорантен 10,0
бенз(а)пирен 7,8
дибенз(а,h)флуорантен 16,7

Проводят два параллельных определения. Допустимое расхождение результатов двух параллельных определений при Р – 0,95 не должно превышать 40 % по отношению, к среднему арифметическому. Минимальная концентрация ПАУ, определяемая данным методом, составляет по бенз(а)пирену 0,2 мкг/кг.

4.4.2. Определение бенз(а)пирена методом спектрофлуориметрии.

Фракцию бенз{а)пирена, выделенную согласно п. 4.3, растворяют в 1 мл бензола. Записывают спектр флуоресценции раствора при длине волны возбуждающего света 386 нм в диапазоне от 400 до 450 нм. Измеряют интенсивность флуоресценции при 406 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор бенз(а)пирена в бензоле с концентрацией 20 – 50 нг/мл, проведенный через все стадии выделения («холостой опыт»,с добавкой 20 – 50 нг бенз(а)пирена). Спектры записывают в одном режиме усиления. При необходимости раствор образца разводят в большем объеме растворителя. Для подтверждения чистоты выделенной фракции бенз(а)пирена записывают также спектры возбуждения при длине волны эмиссионного света 406 нм в диапазоне 280 – 390 нм.

Содержание бенз(а)пирена (X), мкг/кг, в образце рассчитывают по следующей формуле:

$$X = \frac{Y1}{Y2} \cdot C \cdot \frac{1000}{G} \cdot v \text{, где}$$

Y1, *Y2* – интенсивность флуоресценции растворов образца (1) и стандарта (2);

C – концентрация раствора стандарта, мкг/мл;

G – навеска образца, г;

V – объем пробы, мл.

Проводят два параллельных определения. Допустимое расхождение результатов двух параллельных определений при Р = 0,95 не должно превышать 40 % по отношению к среднему арифметическому. Минимальная концентрация ПАУ, определяемая данным методом, составляет 0,2 мкг/кг.

4.4.3. Визуальное определение бенз{а)пирена в тонком слое ацетилированной целлюлозы.

Подготавливают хроматографическую камеру и пластинку с ацетилированной целлюлозой по п. 3 и 4.3.

Подготавливают раствор сравнения бенз{а)пирена с концентрацией 1 мкг/мл и раствор фракции бенз(а)пирена выделенной из образца согласно п. 4.3, в 200 мкл бензола. На стартовую линию пластинки с помощью микрошприца в точки с интервалом 15—20 мм наносят 10 и 20 мкл раствора образца, а также 2,5 и 5 мкл раствора сравнения. Нанесение пробы необходимо осуществлять без контакта со слоем сорбента. Диаметр пятен не должен превышать 5 мм. Пластинку помещают в хроматографическую камеру и дают подняться растворителю на 100 мм *высушивают на воздухе и облучают* УФ-*светом кварцевой лампы с максимумом эмиссии* 366 нм и сравнивают интенсивность флуоресценции пятен образца и стандарта. Количество бенз(а)пирена в образце определяют по пятну стандарта, имеющему ту же интенсивность флуоресценции. Приведенные условия позволяют определить не менее 2,5 – 5 нг бенз(а)пирена в пятне, что соответствует его концентрации 0,5—1 мкг/кг массы биоматериала. При концентрации бенз{а)пирена выше указанной величины следует упарить раствор сделать большее разведение и установить границу между отсутствием флуоресценции пятна и его устойчивым свечением, соответствующим 2,5—5 нг бенз(а)пирена.

Концентрацию бенз(а)пирена в образце рассчитывают по формуле

$$M = \frac{2,5 \cdot Y}{V} \cdot \frac{1000}{G} \, (нг / кг), \text{ где}$$

Y – объем раствора образца, мкл;

V – объем раствора нанесенной пробы, мкл;

2,5 – нижняя граница определения бенз(а)пирена в пятне (2,5 мкл раствора сравнения с концентрацией 1 мкг/мл);

G – навеска образца, г

Проводят два параллельных определения. Допустимое расхождение результатов двух параллельных определений при P = 0,95 не должно превышать 60 % по отношению к среднему арифметическому. Минимальная концентрация ПАУ определяемая данным методом, составляет 0,5 мкг/кг.

gost.e-ecolog.ru