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

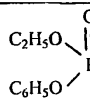
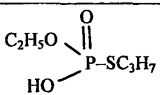
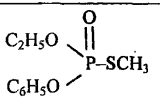
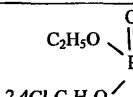
Утверждено 08.06.87 № 4339–87

Методические указания по определению гетерофоса, этафоса и их метаболитов в биологическом материале, молоке, яйцах методом газожидкостной хроматографии*

Краткая характеристика препаратов. Характеристика гетерофоса приведена на с. 61, этафоса – на с. 65.

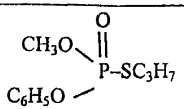
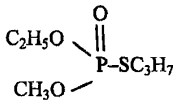
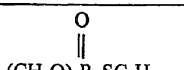
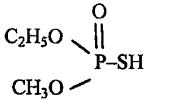
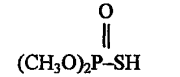
Характеристика метаболитов этафоса и гетерофоса приведена в табл. 28.

28. Характеристика метаболитов гетерофоса и этафоса

Химическое название	Структурная формула	Брутто формула	Молекулярная масса
О-Этил-О-фенил-фосфат		$C_8H_{11}O_4P$	202
О-Этил-S-пропил-фосфат		$C_5H_{13}O_3PS$	184
О-Этил-О-фенил-S-метилтиофосфат		$C_9H_{13}O_3PS$	232
О-Этил-О-фенилтио-фосфат		$C_8H_{11}O_3PS$	218
О-Этил-0,2,4-дихлор-фенилтиофосфт		$C_8H_9O_3Cl_2PS$	251,5

* Разработаны: М.В. Письменной, М.А. Клисенко (ВНИИГИНТОКС) [1]; В.Р. Хаитовым, Г.Л. Холмухамедовой, А.Д. Сайфутдиновой (УзНИВИ) [2].

Продолжение

Химическое название	Структурная формула	Брутто формула	Молекулярная масса
О-Метил-О-фенил-S-пропилтиофосфат		$C_{10}H_{15}O_3PS$	246
О-Этил-О-метил-S-пропилтиофосфат		$C_6H_{15}O_3PS$	198
О,О-Диметил-S-пропилтиофосфат		$C_5H_{13}O_3PS$	184
О-Этил-О-метилтиофосфат		$C_3H_9O_3PS$	156
О,О-Диметилтиофосфат		$C_2H_7O_3PS$	142

Принцип метода. Методика основана на определении S-пропильных ФОП (гетерофоса, этафоса и десяти их метаболитов) методом ГЖХ. Указанные соединения извлекают из субстратов смесью ацетона и 0,1 н. HCl (9 : 1) [1], гетерофос из молока и яиц извлекают смесью ацетона с этанолом (3 : 1) [2|. Экстракты очищают перераспределением в системе жидкость – жидкость.

Определение методом ГЖХ проводят на хроматографе, снабженном ТИД и ДПР. Используют неподвижные фазы SE-30 на хроматоне N-AW-HMDS и 3 % OV-101 на инертоне-супер. Для разделения пестицидов и их метаболитов определение проводят в изотермическом режиме при двух температурах – 190 и 127 °С.

Метрологическая характеристика метода приведена в таблице 29.

Избирательность метода. Определению могут мешать ФОП, имеющие близкие времена удерживания.

Реактивы и растворы. Ацетон ч. Хлороводородная кислота ч., 0,1 н. водный раствор. *н*-Гексан ч., х.ч. Спирт этиловый, ректиф. Сульфат натрия безводный свежеприготовленный. Вода дистиллированная.

29. Метрологическая характеристика метода определения гетерофоса, этафоса и их метаболитов

Вещество	Исследуемый объект	Нижний предел обнаружения, мг/кг	Среднее значение определения, %	Относительное стандартное отклонение	Доверительный интервал среднего при $P - 0,95$, $n - 5$, ±%
Гетерофос	Молоко	0,002	70	6,7	8,3
»	Яйца	0,002	65	6,3	7,8
»	Биологические субстраты*	0,001—0,01**	79	8,3	10,3
Этафос	То же	0,005—0,05	83	12,2	15,1
Метаболиты О-Этил-О-фенилфосфат	»	0,001—0,01	74	13,5	16,8
О-Этил-S-пропилтиофосфат	»	0,005—0,05	79	13,6	16,9
О-Эгил-О-фенил-S-метилтиофосфат	»	0,005—0,05	81	8,1	10,1
О-Этил-О-фенилтиофосфат	»	0,05—0,5	70	3,8	4,7
О-Этил-О-2,4-дихлорфенилтиофосфат	»	0,01—0,1	74	11,1	13,7
О-Метил-О-фенил-S-пропилтиофосфат	»	0,01—0,1	78	4,3	5,3
О-Этил-О-метил-S-пропилтиофосфат	»	0,01—0,1	84	10	12,4
О,О-Диметил-S-пропилтиофосфат	»	0,005—0,05	80	5,5	6,8
О-Этил-О-метилтиофосфат	»	0,05—0,5	81	10,9	13,5
О,О-Диметилтиофосфат	»	0,05—0,5	78	13,8	17,1

* Расчет проведен суммарно для различных органов (печень, почки, мозг и др.).
** Приведены нижние пределы обнаружения в исследуемых объектах в зависимости от взятой навески (2—20 г).

Неподвижная фаза – 5 % SE-30 на хроматоне N-AW-HMDS (0,16—0,20 мм), 3 % OV-101 на инертоне-супер (0,16—0,20 мм). Азот особой чистоты, содержание O_2 не более 0,003 %. Водород. Основные стандартные растворы гетерофоса, этафоса и их метаболитов в *н*-гексане по 1000 мкг/мл. Хранят в холодильнике 6 мес. Рабочие стандартные растворы гетерофоса, этафоса и метаболитов в *н*-гексане по 10 мкг/мл. Хранят в холодильнике в течение двух недель. Готовят серию стандартных растворов.

Приборы и посуда. Газовый хроматограф с ТИД и ДЭЗ марки «Цвет», «Газохром» и др. Микроизмельчитель тканей РТ-2 или мясорубка. Прибор для отгонки растворителей (ротационный вакуумный испаритель) типа ИР-1М. Микрошприцы на 10 мкл (МШ-10). Колбы: конические со шлифом и пробками вместимостью 100; 250 и 500 мл; круглодонные со шлифом для отгонки растворителей; мерные вместимостью 50 и 100 мл. Делительные воронки на 50; 100 и 250 мл. Воронки химические. Пробирки мерные со шлифом вместимостью 5 и 10 мл. Пипетки на 1; 5 и 10 мл. Микропипетки на 0,1 мл.

Подготовка к определению. Для проведения клинических исследований на содержание гетерофоса и этафоса отбирают 100 мл суточной мочи; 2 мл крови.

Подготовка хроматографической колонки для ГЖХ. Колонку заполняют общепринятым в хроматографии способом, кондиционируют 48 ч при температуре на 20 °С выше рабочей температуры колонки.

Ход анализа. Экстракция и очистка экстракта. Исследуемые *органы и ткани* (печень, почки, селезенка, легкие, головной мозг, мясо) измельчают в микроизмельчителе тканей или мясорубке. Отбирают 2—20 г средней пробы (для пищевых продуктов навеска 20 г), заливают в зависимости от взятой навески 15—250 мл смеси ацетона с 0,1 н. хлороводородной кислотой (9 : 1) и оставляют на 1 ч, периодически перемешивая пробу стеклянной палочкой и встряхивая. Затем растворитель сливают в делительную воронку, фильтруя через вату. Заливают пробу новой порцией смеси и экстрагируют еще 30 мин. Экстракты объединяют. Пробу промывают смесью дважды порциями по 5—10 мл и смывы присоединяют к экстракту. В делительную воронку приливают 50 мл дистиллированной воды, перемешивают и добавляют 50 мл *н*-гексана. Осторожно встряхивают в течение 5 мин. Отделяют верхний *н*-гексановый слой, сливая его через безводный сульфат натрия (7—10 г), насыпанный на фильтр, вложенный в воронку. Из нижнего водного слоя экстрагируют ФОП *н*-гексаном еще два раза порциями по 40 мл, объединяя экстракты

с первым. Упаривают экстракт на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани 40—45 °С примерно до 1 мл. Переносят остаток в мерную пробирку со шлифом, ополаскивая колбу небольшими порциями (по 0,3—0,4 мл) *н*-гексана. Доводят объем в пробирке *н*-гексаном точно до 2 мл, перемешивают и аликвоту хроматографируют.

К 2—5 мл цельной *крови,* собранной в стаканы вместимостью 50—100 мл, прибавляют при непрерывном перемешивании стеклянной палочкой безводный сульфат натрия до образования сухой массы (20 г). Затем приливают 30—40 мл диэтилового эфира и 10 мин перемешивают пробу с эфиром. Сливают эфир в колбу для отгонки растворителей, фильтруя через фильтр «красная лента». Экстракцию повторяют еще раз. Эфирные экстракты объединяют, упаривают на ротационном испарителе при температуре бани 20—25 °С до объема 1—2 мл. Остаток упаривают досуха при комнатной температуре. К сухому остатку в колбе прибавляют 1 мл *н*-гексана и аликвоту хроматографируют.

Пробу *мочи* (20 мл) переносят в делительную воронку, разбавляют 20 мл дистиллированной воды, перемешивают и прибавляют 20 мл диэтилового эфира. Осторожно встряхивают 5 мин и дают отстояться. Отделяют верхний эфирный слой, сливая его через безводный сульфат натрия. Операцию экстрагирования повторяют дважды. Объединенные экстракты переносят в колбу для отгонки растворителей и далее поступают так же, как при экстракции из крови.

Из 10 г (мл) средней пробы *молока, яиц, органов и тканей* гетерофос извлекают 50 мл смеси ацетона с этанолом (3 : 1) |2|. Экстрагируют при встряхивании в течение 20 мин, после чего экстракты помещают в морозильную камеру холодильника на 1 ч. Пробы фильтруют через бумажный фильтр в колбы для отгонки либо в фарфоровые чашки, промывают посуду и фильтр 20 мл экстрагирующей смеси. Фильтрат концентрируют под вакуумом на ротационном испарителе (температура бани 40 °С) или упаривают в фарфоровых чашках на водяной бане при температуре 40 °С в слабом токе теплого воздуха до объема 1—2 мл. Остатки фильтруют через бумажный фильтр в делительные воронки. Колбы для отгонки или фарфоровые чашки тщательно ополаскивают 10 мл смеси этанола с водой (1 : 3), фильтруют в те же делительные воронки, добавляют 25 мл дистиллированной воды и встряхивают 0,5—1 мин. Из водно-спиртового раствора гетерофос трижды экстрагируют гексаном порциями по 30 мл в течение 2—3 мин при встряхивании. Объединенный гексановый экстракт сушат безводным сульфатом натрия, помещают в

колбы для отгонки или в фарфоровые чашки и концентрируют до объема 0,5 мл. Оставшийся растворитель отгоняют досуха при комнатной температуре. Сухой остаток растворяют в 5 мл этилового спирта и аликвотную часть (2—3 мкл) хроматографируют.

30. Время удерживания при различных температурах, пределы обнаружения и концентрации рабочих растворов гетерофоса, этафоса и их метаболитов

№ п/п	Исследуемое соединение	Температура колонки, °С	Время удерживания		Относительное время удерживания	Концентрация рабочего раствора*, мкг/мл	Нижний предел обнаружения, нг	
			ТИД	ДПР			ТИД	ДПР
Фаза – 5 % SE-30 на хроматоне N-AW-HMDS[1], температура испарителя 210 °С								
1	2	3	4		5	6	7	
1	Гетерофос	190	3 мин 36 с	–	1	0,2	0,1	– –
	»	127	25 мин	–	1	2,0	1,0	
2	Этафос	190	10 мин 36 с	4 мин 30 с	2,95	5,0 (0,1)**	1,2	0,1
Метаболиты								
1	О-Этил-О-фенилфосфат	190	1 мин 30 с	–	0,42	1,0	0,2	–
2	О-Этил-S-пропилфосфат	190	54 с	–	0,25	0,5	0,1	–
	То же	127	6 мин 15 с	–	–	–	–	–
3	О-Этил-О-фенил-S-метилтиофосфат	190	2 мин 12 с	–	0,62	0,5	0,1	–
4	О-Этил-О-фенилтиофосфат	190	2 мин 48 с	–	0,80	3,0	1,0	–
5	О-Этил-0,2,4-дихлорфенилтиофосфат	190	5 мин 18 с	3 мин 24 с	1,46	5,0 (1)**	1,2	0,2

Продолжение таблицы

1	2	3	4		5	6	7	
6	О-метил-О-фенил-S-пропилтиофосфат	190 190	1 мин 54 с 3 мин	–	0,53 0,85	1,0	0,2	–
7	О-Этил-О-метил-S-пропилтиофосфат	127	4 мин 42 с	–	0,19	0,5	0,2	–
8	О,О-Диметил-S-пропилтиофосфат	127	3 мин 30 с	–	0,14	0,5	0,1	–
9	О-Этил-О-метилтиофосфат	127	2 мин 12 с	–	0,09	2,0	2,0	–
10	О,О-Диметилтиофосфат	127	1 мин 42 с	–	0,07	2,0	1,0	–
Фаза – 3 % OV-101 на инертоне-супер [2], температура испарителя 225 °С								
1	Гетерофос	190	2 мин 42 с	–	–	0,1	0,02	–

* Для удобства работы можно приготовить смеси, в которых концентрация каждого соединения соответствует его концентрации, указанной и таблице для рабочих растворов. Смесь I: гетерофос, метаболиты № 1, 2, 3, 4, 6. Смесь II: гетерофос, метаболит № 5. Смесь III: метаболиты № 7, 8, 9, 10.
** В скобках указана концентрация раствора при работе с ДПР.

Условия хроматографирования. Хроматограф марки «Цвет» с ТИД и ДПР. Колонка стеклянная спиральная длиной 1 м с диаметром 3 мм, заполненная хроматоном N-AW-HMDS (0,16—0,20 мм) с 5 % SE-30 либо инертоном-супер N (0,16—0,20 мм) с 3 % OV-101. Рабочая шкала электрометра при работе с ТИД $2 \cdot 10^{-10}$А, при работе с ДПР $20 \cdot 10^{-12}$А. Скорость протяжки диаграммной ленты 240 мм/ч. При работе на ТИД расход газа-носителя (азота) 22 мл/мин, водорода – 14—17 мл/мин, воздуха – 400 мл/мин. При работе на ДПР расход газаносителя (азота) 60 мл/мин, расход на продувку детектора 150 мл/мин. Температура (°С): испарителя – 210, детектора – 230, колонки – 190 и 127.

Время удерживания и пределы обнаружения исследуемых соединений при указанных условиях определения методом ГЖХ приведены в таблице 30.

Обработка результатов анализа. Количественное определение проводят методом абсолютной калибровки. Для этого до и после анализа проб вводят в хроматограф по 3—5 мкл рабочих стандартных растворов. Измеряют высоту пиков и вычисляют среднее арифметическое из пяти

определений. Если при введении в хроматограф аликвотной части (3—5 мкл) конечного экстракта пробы получаются слишком большие пики или происходит «зашкаливание», пробу разбавляют *н*-гексаном. Для определения гетерофоса и всех его метаболитов каждую пробу следует анализировать при двух температурах колонки (190 и 127 °С) используя соответствующие стандарты.

Содержание пестицида или его метаболитов в пробе (X, мг/кг, мг/л) рассчитывают по формуле

$$X = \frac{AV_2H_1VK}{H_2V_1P}, \text{ где}$$

A – количество пестицида или метаболита в стандартном растворе, введенном в хроматограф, мкг/мл;

V_2 – объем стандартного раствора, введенного в хроматограф, мкл;

H_2 – высота пика стандартного раствора, введенного в хроматограф, мм;

H_1 – высота пика исследуемого раствора, мм;

V_1 – объем экстракта, введенного в хроматограф, мкл;

V – объем анализируемого экстракта, мл;

P – навеска или объем анализируемой пробы, г (мл);

K – поправочный коэффициент, составляющий для мяса, молока и яиц 1,2; 1,4; 1,5 соответственно.

Требования **безопасности. Соблюдают общепринятые правила безопасности при работе с органическими растворителями и токсичными веществами.**

gost.e-ecolog.ru