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 12

МОСКВА 2009

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 12

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, 2009.—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 16.12.09

Формат 60x88/16 Печ. л. 4,75

Тираж 200 экз. Заказ 100

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, 2009
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009

Содержание

Унифицированные правила отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов 4

Методические указания по определению хлорорганических пестицидов в воде, продуктах питания, кормах и табачных изделиях методом хроматографии в тонком слое 29

Методические указания по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства 46

Методика определения афлатоксинов в пищевых продуктах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии 69

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АФЛАТОКСИНОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ*

Оборудование и материалы

1. Аппарат для встряхивания проб типа АВУ-6С по ТУ 64-1-2451—78.

2. Ротационный испаритель с ловушкой по ТУ 25-11-917—76 (завод «Химлаборприбор»).

3. Кофемолка ЭКМ-ЗУ.

4. Прибор для флуоресцентного анализа витаминов в растворе (модель 833) ТУ 64-1-1080—78 или диагностическая лампа ОЛД-41.

5. Жидкостный хроматограф высокой эффективности «Altex» модель 336 или другой хроматограф с аналогичными параметрами; колонка и предколонка с силикагелем типа «Ultrasphere Sf», с размером частиц 5 микрон; длина колонки 25 см, предколонки 4,5 см, внутренний диаметр колонок 0,46 см; флуоресцентный детектор «Kratos» модель FS-970 с кюветой, заполненной силикагелем, или другой детектор с аналогичными параметрами; ультрафиолетовый детектор «Kratos».

6. Микрошприц на 25 мкл.

7. Стеклянные камеры для ТСХ с притертыми крышками, например, стеклянные четырехугольные сосуды 195 х 195 х 200 мм завода «Дружная горка».

8. Пластины для ТСХ «Силуфол» размером 15 х 15 или 20 х 20 см, ЧССР.

9. Воронки делительные ВД2-250 или ВД2-500 по ГОСТ 8613—75.

10. Силикагель для колоночной хроматографии с размером частиц 100—250 микрон (силикагель ЧССР).

11. Цилиндры мерные на 100 мл с притертой пробкой, тип 2—100 ГОСТ 1770—74.

12. Цилиндры мерные на 250 мл с притертой пробкой, тип 2—250 по ГОСТ 1770—74.

13. Колбы плоскодонные конические на 250 и 500 мл с НШ 29 тип КнКШ 250-29/32 и 500-29/32 по ГОСТ 10394—72.

14. Колбы круглодонные на 1000 мл с НШ 29, тип ККШ-250-29/32 по ГОСТ 10395—72.

15. Колбы грушевидные на 50 мл с НШ 14,5, тип ГрКШ-50-14/23 по ГОСТ 10394—72.

---

* Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания афлатоксинов в продовольственном сырье и пищевых продуктах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, утв. МЗ СССР 20.03.86 № 4082—86

16. Воронки химические диаметром 150 мл по ГОСТ 8613—75.
17. Колонка стеклянная хроматографическая 2300 × 15 мм.
18. Распылитель стеклянный с грушей.
19. Афлатоксин B_1 или смесь афлатоксинов B_1, B_2, G_1, G_2.
20. Афлатоксин M_1.
21. Ацетон по ГОСТ 2603—71.
22. Гекеан по ТУ 6-09-3375—73.
23. Бензол по ГОСТ 5955—75.
24. Ацетонитрил по ТУ 6-09-3543—74.
25. Метанол по ГОСТ 6995—77.
26. Хлороформ медицинский или по ГОСТ 3160—51.
27. Эфир диэтиловый медицинский по ГОСТ 6265—52.
28. Вода дистиллированная.
29. Кислота лимонная по ГОСТ 3652—29.
30. Кислота азотная концентрированная по ГОСТ 4461—67.
31. Сульфат натрия безводный по ГОСТ 4166—76.
32. Натрий хлористый по ГОСТ 4233—66.
33. Свинец уксуснокислый по ГОСТ 1027—67.
34. Окись алюминия для колоночной хроматографии (нейтральный) 40/250 (ЧССР).

1. Определение афлатоксинов B_1 B_2, G_1 G_2 в пищевых продуктах

1.1. Экстракция

При отборе проб следует руководствоваться требованиями ГОСТ 12330—66 «Сельскохозяйственная продукция. Методы отбора образцов при карантинном досмотре и экспертизе». Отобранную пробу измельчают в течение 1—2 минут в кофемолке или лабораторной мельнице. Навеску 25 г измельченного продукта помещают в плоскодонную коническую колбу на 250 мл, тщательно перемешивают с 25 мл 10 %-ного раствора хлорида натрия. Добавляют 100 мл ацетона и встряхивают на аппарате для встряхивания в течение 30 минут. Полученную смесь фильтруют через бумажный складчатый фильтр, отбирают 50 мл фильтрата.

1.2. Очистка экстракта

К 50 мл фильтрата добавляют 20 мл 15 %-ного раствора ацетата свинца и 30 мл дистиллированной воды, перемешивают и оставляют стоять на 10 минут в темноте. Отфильтровывают образовавшийся осадок через бумажный складчатый фильтр, отбирают 80 мл фильтрата. Обезжиривают в делительной воронке гексаном (2 × 30 мл), затем пере-

экстрагируют в хлороформ (1-ый раз 30 мл хлороформа, 2-ой раз смесью хлороформ-ацетон, 3 : 1 – 45 мл). Объединенные хлороформные экстракты помещают в плоскодонную колбу на 250 мл, добавляют 5—7 г безводного сульфата натрия, встряхивают и оставляют стоять на 30 минут в темноте. Раствор фильтруют через кусочек ваты, помещенный в химическую воронку, в грушевидную колбу. Хлороформный раствор упаривают на ротационном испарителе до объема 1 мл. Далее производят очистку экстракта с помощью колоночной хроматографии.

На дно стеклянной колонки помещают кусочек ваты, затем безводный сульфат натрия (толщина слоя 5 мм), наливают суспензию 2 г силикагеля в хлороформе, сверху насыпают слой безводного сульфата натрия (20 мм). Дают хлороформу стечь, затем на колонку наносят хлороформный экстракт образца, элюируют смесью хлороформ-ацетон (9 : 1) 60 мл. Элюат упаривают досуха на ротационном испарителе, остаток растворяют в 2 мл хлороформа, фильтруют через бумажный или капроновый фильтр в пробирку емкостью 5 мл, отдувают растворитель в токе азота, остаток растворяют в 400 мкл хлороформа (раствор А) и анализируют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

1.3. Приготовление стандартных растворов афлатоксинов B_1, B_2, G_1, G_2

Стандартные растворы готовят следующим образом: навески кристаллических афлатоксинов B_1, B_2, G_1, G_2 в 1 мг помещают в мерные колбы на 100 мл и доводят до метки смесью бензол-ацетонитрил (98 : 2). Концентрации афлатоксинов в приготовленных стандартных растворах составляют 10 нг/мкл.

Для приготовления рабочего раствора смеси афлатоксинов B_1, B_2, G_1 и G_2 с концентрациями 0,5 нг/мкл, 0,25 нг/мкл, 0,2 нг/мкл и 0,1 нг/мкл соответственно в мерную колбу на 50 мл помещают 2,5 мл стандартного раствора афлатоксина B_1; 1,25 мл B_2; 1,0 мл G_1 и 0,5 мл G_2, затем доводят до метки смесью бензол-ацетонитрил (98 : 2).

Стандартный раствор хранится в холодильнике при температуре ниже 0 °С, срок годности стандартного раствора 1 год.

1.4. Обнаружение и количественное определение афлатоксинов B_1, B_2, G_1 и G_2 с помощью ВЭЖХ

Условия ВЭЖХ: подвижная фаза — эфир-метанол-вода 95 : 4 : 1, скорость потока подвижной фазы—1 мл/мин. Рекомендуется использовать перегнанный метанол и бидистиллированную воду. Эфир перед использованием пропускают через колонку с оксидом алюминия. Все растворители необходимо предварительно отфильтровать. Флуоресцентный детектор устанавливается на длину волны возбуждающего из-

лучения 360 нм (или устанавливается соответствующий фильтр на линии возбуждения при работе с флуоресцентным детектором без монохроматора), на линии эмиссии устанавливается эмиссионный фильтр с полосой пропускания от 418 нм. Входное напряжение самописца – 10 мВ, чувствительность детектора устанавливается таким образом, чтобы 1 нг афлатоксина B_1 соответствовало отклонение пера на полную шкалу самописца при уровне шума от 3 до 5 % от полной шкалы. Предел обнаружения при таких условиях составляет около 0,1 нг афлатоксина B_1 во вколе (при флуоресцентном детектировании).

Для калибровки прибора по флуоресцентному детектору в инжектор с помощью микрошприца вводится 1 мкл рабочего раствора для ВЭЖХ (соответствует 0,5 нг афлатоксина B_1, 0,25 нг B_2, 0,2 нг G_1 и 0,1 нг G_2) и 2 мкл рабочего раствора (1 нг B_1, 0,5 нг B_2, 0,4 нг G_1 и 0,2 нг G_2). Для каждого количества афлатоксинов определяют высоту пика. В приведенных выше условиях время выхода растворителя составляет 3,0—3,5 мин., времена удерживания афлатоксинов: для B_1 9,0—10,0 мин., для B_2 11,0—11,8 мин., для G_1 13,0—14,0 мин., для G_2 15,6—17,0 мин. в зависимости от небольших изменений в составе подвижной фазы и времени уравновешивания колонки.

При высоких уровнях загрязнения пищевого продукта афлатоксинами (свыше 10 мкг/кг по афлатоксину B_1) рекомендуется использовать также показания УФ-детектора. Калибровку прибора по УФ-детектору проводят также, как в случае флуоресцентного детектора, вводя в петлю инжектора 10, 15 и 20 мкл рабочего раствора (соответствует 5; 7,5 и 10 нг афлатоксина B_1; 2,5; 3,75 и 5 нг афлатоксина B_2; 2, 3 и 4 нг G_1; 1; 1,5 и 2 нг G_2). Предел обнаружения по УФ-детектору составляет 1 нг по афлатоксину B_1.

В инжектор хроматографа вводится с помощью микрошприца 20 мкл раствора А. При наличии пика, совпадающего по времени удерживания с афлатоксином B_1 (B_2, Gi, G_2) определяют его высоту (h). Расчет концентрации афлатоксина проводят по формуле:

$$C = \frac{V_1 \cdot V_3 \cdot V_5 \cdot m_{ст} \cdot h}{V_2 \cdot V_4 \cdot V_6 \cdot M \cdot h_{ст}}, \text{ где}$$

C – концентрация афлатоксинов в пищевом продукте в мкг/кг;

V_1 – объем водно-ацетоновой смеси в мл (125 мл);

V_2 – объем водно-ацетонового фильтрата, взятый для анализа (50 мл);

V_3 – объем водно-ацетонового фильтрата и раствора ацетата свинца (100 мл);

V_4 – объем фильтрата после очистки ацетатом свинца (80 мл);

V_5 – объем очищенного раствора экстракта в хлороформе перед ВЭЖХ (400 мкл);

V_6 – объем раствора экстракта, вводимого в петлю инжектора хроматографа (20 мкл);

$m_{ст}$ – количество нг афлатоксина в введенном объеме стандарта;

$h_{ст}$ – высота пика стандартна афлатоксина в мм;

h – высота пика афлатоксина в введенном объеме экстракта в мм;

M – навеска продукта, взятая в г.

При приведенных в скобках объемах и навесках формула содержания афлатоксинов выражается следующим образом:

$$C = 2,5\frac{h}{h_{ст}} \cdot m_{ст}$$

Пели пик афлатоксина выходит за пределы шкалы самописца, анализ с помощью ВЭЖХ проводят повторно, уменьшая объем вводимого раствора экстратка (V_6) или разбавляя раствор экстракта хлороформом (увеличивая объем V_5). При необходимости подтверждения проводят совместный ввод экстракта со стандартом афлатоксинов.

1.5. Подтверждение наличия афлатоксинов с помощью двумерной ТСХ

Для подтверждения наличия афлатоксинов пластинку «Силуфол» размечают тонкими карандашными линиями. В правом нижнем углу на расстоянии 1,5 см от краев наносят 20 мкл раствора А, в правом верхнем углу наносят 5 мкл рабочего раствора смеси афлатоксинов. В левом нижнем углу на расстоянии 1, 2 и 3 см от левого края и 1,5 см от нижнего края пластинки наносят 2, 5 и 10 мкл рабочего раствора смеси афлатоксинов. Пластинку помещают в камеру для ТСХ со смесью эфир-метанол-вода (94 : 4,5 : 1,5) и развивают пластинку в 1-ом направлении до достижения фронтом растворителя тонкой карандашной линии, проведенной в 3 см от верхнего края пластинки. Пластинку извлекают и сушат на воздухе 5 минут, затем развитие пластинки проводят во втором направлении в системе хлороформ-ацетон-вода (90 : 10 : 1). После достижения фронтом растворителя тонкой карандашной линии ее извлекают из камеры и сушат на воздухе. Рассматривают пластинку в длинноволновом УФ-свете. Обнаружение на пластинке пятен, соответствующих по хроматографической подвижности и цвету флуоресценции пятнам стандартов афлатоксинов, свидетельствует о возможном присутствии афлатоксинов в пищевом продукте. Для подтверждения наличия афлатоксинов ТСХ-пластинку опрыскивают раствором азотной кислоты

в воде (1 : 2) и рассматривают ее в длинноволновом УФ-свете. Если цвет флуоресценции стандартов афлатоксинов изменился с синего (B_1, B_2) или сине-зеленого (G_1, G_2) на желтый цвет, а цвет флуоресценции пятен экстракта на желтый не изменился, то афлатоксины в пробе отсутствуют. Если же цвет флуоресценции пятен экстракта также изменился на желтый, то это служит подтверждением возможного наличия афлатоксинов в пищевом продукте.

2. Определение афлатоксинов B_1 B_2, G_1 и G_2 в маслах

2.1. Экстракция

К 15 г масла добавляют 25 мл гексана, 5 мл 4 %-ного раствора хлорида натрия и 100 мл ацетонитрила. Встряхивают на аппарате для встряхивания в течение 40—50 минут. Затем смесь помещают в делительную воронку и отделяют нижний ацетонитрильный слой.

2.2. Очистка экстракта

Ацетонитрильный экстракт обезжиривают в делительной воронке гексаном (3 × 50 мл), высушивают сульфатом натрия и упаривают досуха. Остаток растворяют в 2 мл хлороформа и проводят очистку с помощью колоночной хроматографии. На колонку с 4 г силикагеля (п. 1.2) наносят хлороформный экстракт, дают хлороформу стечь и промывают 100 мл смеси гексан-бензол-эфир (1 : 1 : 2). Афлатоксины элюируют 100 мл смеси хлороформ-ацетон (9 : 1). Элюат упаривают досуха. Остаток растворяют в 2 мл хлороформа, фильтруют через бумажный или капроновый фильтр, отдувают растворитель в токе азота, растворяют в 400 мкл хлороформа и анализируют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (п. 1.4).

Расчет концен трации афлатоксина проводят по формуле:

$$C = \frac{V_1 \cdot h \cdot m_{ст}}{V_2 \cdot h_{ст} \cdot M}, \text{ где}$$

C – концентрация афлатоксина в масле;

V_1 – объем очищенного раствора экстракта в хлороформе перед ВЭЖХ (200 мкл);

V_2 – объем раствора экстракта, вводимого в петлю инжектора хроматографа (20 мкл);

$m_{ст}$ – количество нг афлатоксина во введенном объеме стандарта;

$h_{ст}$ – высота пика стандарта афлатоксина в мм;

h – высота пика афлатоксина во введенном объеме экстракта в мм;

M – навеска продукта, взятая в г.

Подтверждение наличия афлатоксина с помощью двумерной ТСХ проводят аналогично п. 1.5.

3. Определение афлатоксина M_1 в молоке

3.1. Экстракция

В коническую колбу на 250 мл помещают 50 мл натурального молока или раствор 5 г сухого молока в 50 мл воды, 10 мл водного раствора 2 г хлорида натрия и 0,24 г лимонной кислоты, 120 мл хлороформа (все составные части предварительно подогревают до температуры 35—38°. Содержимое колбы встряхивают 2—3 минуты, переносят в центрифужные стаканы и центрифугируют 15 минут при 3000—4000 об/мин. Отделяют нижний хлороформный слой, высушивают над 10 г безводного сульфата натрия, отфильтровывают, замеряют объем фильтрата (V_2) и упаривают до 5 мл.

Очистку проводят с помощью колоночной хроматографии. На дно стеклянной колонки помещают кусочек ваты, затем безводный сульфат натрия (толщина слоя 5 мм), заливают суспензию 2 г (2 мл) силикагеля в гексане и сверху насыпают слой безводного сульфата натрия. Дают гексану стечь так, чтобы над слоем сульфата натрия осталось около 5 мл гексана. Вносят 5 мл анализируемого экстракта, дают растворителю стечь и затем колонку последовательно промывают 25 мл смеси толуол-уксусная кислота (9,5 : 0,5), 25 мл гексана и 25 мл смеси эфир-гексан-ацетонитрил (5 : 3 : 1). Афлатоксин M_1 элюируют с колонки 60 мл смеси хлороформ-ацетон (4 : 1). Элюат упаривают досуха, растворяют в 200 мкл хлороформа и анализируют с помощью высокоэффективной хроматографии.

3.2. Приготовление стандартного раствора афлатоксина M_1

Навеску кристаллического афлатоксина M_1 в 1 мг помещают в мерную на 100 мл колбу и доводят до метки смесью бензол-ацетонитрил (9 : 1). Концентрация афлатоксина M_1 в приготовленном стандартном растворе составляет 10 нг/мкл. Для приготовления стандартного раствора афлатоксина M_1 с концентрацией 0,2 нг/мкл в мерную колбу на 50 мл помещают 1 мл стандартного раствора афлатоксина M_1 и доводят до метки смесью бензол-ацетонитрил (9 : 1).

3.3. Обнаружение и количественное определение афлатоксина M_1 с помощью ВЭЖХ

Условия ВЭЖХ: подвижная фаза эфир-метанол-вода (90 : 8 : 2), остальные параметры как в п. 1.4. Чувствительность детектора устанавливается таким образом, чтобы 0,6—0,8 нг афлатоксина M_1 соответствовало отклонение пера на полную шкалу самописца при уровне шума от 3

до 5 % от полной шкалы. Для калибровки флуоресцентного детектора в инжектор вводится 1, 2, 3 мкл рабочего афлатоксина M_1, что соответствует 0,2; 0,4; 0,6 нг афлатоксина M_1. Для каждого количества афлатоксинов определяют высоту пика. В приведенных выше условиях ВЭЖХ время удерживания афлатоксина M_1 8—9 минут.

В инжектор хроматографа вводится с помощью микрошприца 20 мкл раствора очищенного экстракта. При наличии пика, совпадающего по времени выхода с афлатоксином M_1 определяют его высоту (h). Расчет концентрации афлатоксина M_1 проводят по формуле:

$$C = \frac{V_1 \cdot V_3 \cdot h \cdot m_{ст}}{V_2 \cdot V_4 \cdot h_{ст} \cdot M}, \text{ где}$$

C – концентрация афлатоксина M_1 в молоке, мкг/кг;

V_1 – объем хлороформа, взятого для экстракции (120 мл);

V_2 – объем хлороформного экстракта, взятого для анализа;

V_3 – объем очищенного экстракта в хлороформе перед ВЭЖХ (200 мкл);

V_4 – объем раствора экстракта, вводимого в петлю инжектора хроматографа (20 мкл);

$m_{ст}$ – количество нг афлатоксина M_1 в введенном объеме стандарта;

$h_{ст}$ – высота пика стандарта афлатоксина в мм;

h – высота пика афлатоксина в введенном объеме экстракта в мм;

M – навеска продукта, взятая в г.

Если пик афлатоксина M_1 в образце выходит за пределы шкалы самописца, анализ с помощью ВЭЖХ проводят повторно, уменьшая объем вводимого раствора экстракта (V_4) или разбавляя раствор экстракта хлороформом (увеличивая объем V_3).

3.4. Подтверждение наличия афлатоксина M_1 с помощью двумерной ТСХ

Очистка и обнаружение афлатоксина M_1

ТСХ-очистку и обнаружение афлатоксина M_1 проводят с помощью двумерной ТСХ на пластинках «Силуфол» аналогично п. 1.5. В качестве растворителей для развития хроматограмм используют в первом направлении смесь эфир-метанол-вода (90 : 8 : 2), во втором направлении смесь хлороформ-ацетон-изопропиловый спирт (85 : 10 : 5).

Тесты, подтверждающие наличие афлатоксина M_1в продукте.

Тесты, подтверждающие наличие афлатоксина M_1 в продукте, проводят аналогично п. 1.5.

gost.e-ecolog.ru