ГОСТ Р 51440—99
(ИСО 8128—2—93)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СОК ЯБЛОЧНЫЙ, СОК ЯБЛОЧНЫЙ КОНЦЕНТРИРОВАННЫЙ И НАПИТКИ, СОДЕРЖАЩИЕ ЯБЛОЧНЫЙ СОК

Метод определения содержания патулина с помощью тонкослойной хроматографии

Издание официальное

ГОССТАНДАРТ РОССИИ
Москва

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Всероссийским научно-исследовательским институтом консервной и овощесушильной промышленности (ВНИИКОП)

ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 93 «Продукты переработки плодов и овощей»

2 ПРИНЯТ И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Госстандарта России от 22 декабря 1999 г. № 595-ст

3 Стандарт содержит аутентичный текст международного стандарта ИСО 8128—2:1993 «Сок яблочный, сок яблочный концентрированный и напитки, содержащие яблочный сок. Определение содержания патулина. Часть 2. Метод тонкослойной хроматографии», кроме приложения «Библиография»

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта России

© ИПК Издательство стандартов, 2000
© СТАНДАРТИНФОРМ, 2008
Переиздание (по состоянию на июль 2008 г.)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СОК ЯБЛОЧНЫЙ, СОК ЯБЛОЧНЫЙ КОНЦЕНТРИРОВАННЫЙ И НАПИТКИ, СОДЕРЖАЩИЕ ЯБЛОЧНЫЙ СОК

Метод определения содержания патулина с помощью тонкослойной хроматографии

Apple juice, apple juice concentrates and drinks containing apple juice.
Method for determination of patulin content using thin-layer chromatography

Дата введения 2001—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения содержания патулина в яблочных соках, концентрированных яблочных соках и напитках, содержащих яблочный сок, с помощью тонкослойной хроматографии.

Предел обнаружения патулина настоящим методом составляет 25 мкг/дм^3 при условии, что взятый для анализа объем пробы готового к употреблению сока составляет 50 см^3.

2 Сущность метода

Патулин экстрагируют из исследуемой пробы смесью этилацетата с хлороформом (3:2 по объему). Экстракт очищают на колонке с силикагелем. Количественный и качественный анализ экстракта проводят с помощью двумерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) при проявлении пятен раствором гидрохлорида гидразона 3-метил-2-бензотиазолина (МБТГ).

3 Реактивы

Используют реактивы аналитической чистоты и воду квалификации «для хроматографии».

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ — При работе с бензолом и хлороформом следует соблюдать особую осторожность, поскольку эти растворители токсичны и взрывоопасны.

3.1 Растворители: этилацетат, хлороформ и толуол.

3.2 Подвижные фазы для двумерной ТСХ:

бензол/метанол/уксусная кислота (массовой долей 80 %) (19:2:1 по объему);

толуол/этилацетат/муравьиная кислота (массовой долей 90 %) (5:4:1 по объему).

3.3 Силикагель для колоночной хроматографии с размером частиц от 0,063 до 0,2 мм.

3.4 Элюирующий раствор: смесь толуола с этилацетатом (75:25 по объему).

3.5 Стандартный раствор патулина ($C_7H_6O_4$)

3.5.1 Приготовление стандартного раствора патулина

Навеску патулина массой 10,0 мг, взятую с точностью до 0,1 мг, растворяют в мерной колбе с одной отметкой вместимостью 100 см^3 в этилацетате (3.1). Объем содержимого в колбе доводят до отметки этилацетатом.

Пипеткой переносят 10,0 см^3 приготовленного раствора в другую мерную колбу с одной отметкой вместимостью 100 см^3, объем содержимого в колбе доводят до отметки этилацетатом. Массовая концентрация патулина в приготовленном стандартном растворе составляет около 10 мкг/см^3.

Издание официальное

Измеряют оптическую плотность стандартного раствора при длине волны 276 нм на подходящем спектрофотометре с использованием кварцевых кювет рабочей длиной 10 мм.

3.5.2 Расчет концентрации стандартного раствора патулина

Концентрацию стандартного раствора патулина (3.5.1) ρ_{ps}, мгк/см^3, рассчитывают по формуле

$$\rho_{ps} = \frac{A\,M\,1000\,C}{A_{276}}, \qquad (1)$$

где A — оптическая плотность стандартного раствора патулина;

A_{276} — молярный показатель поглощения раствора патулина при длине волны 276 нм, дм^3 · моль$^{-1}$ · см$^{-1}$ (A_{276} = 14600);

M — молярная масса патулина, г/моль;

C — постоянная прибора (обычно C = 1).

3.6 Приготовление раствора гидрохлорида МБТГ

Навеску моногидрата гидрохлорида гидразона 3-метил-2-бензотиазолина (МБТГ) массой 0,5 г растворяют в 100 см^3 воды.

Приготовленный раствор хранят в холодильнике. Срок годности раствора — 3 сут.

4 Приборы и лабораторное оборудование

Перед использованием лабораторное оборудование промывают раствором гипохлорита натрия концентрации 10 г/см^3.

Обычное лабораторное оборудование, в частности, следующее:

4.1 Хроматографическая колонка длиной 300 мм, внутренним диаметром 22 мм, с резервуаром вместимостью 250 см^3 и запорным краном, снабженная с выходного конца пористым стеклянным диском.

4.2 Оборудование для ТСХ: стеклянные хроматографические камеры, длинноволновая ультрафиолетовая лампа (360 нм) и устройство для опрыскивания.

4.3 Флюороденситометр.

4.4 Пластинки для ТСХ размером 20×20 см, покрытые силикагелем (3.3) толщиной слоя 0,25 мм, без флюоресцентного индикатора.

4.5 Сушильный шкаф с принудительной вентиляцией, пригодный для работы при (130±1) °С.

5 Отбор проб

Проба, поступающая в лабораторию, должна быть представительной и без следов порчи или изменения свойств продукта при транспортировании и хранении.

6 Проведение испытаний

6.1 Приготовление испытуемого раствора

При испытании концентрированных яблочных соков их разводят водой 1:5 по объему. Дальнейшую процедуру проводят для всех продуктов одинаково, как описано ниже.

Пробу объемом 50 см^3 экстрагируют порцией смеси этилацетата с хлороформом (3:2 по объему) объемом 50 см^3 в течение не менее 1 мин. Экстракцию повторяют еще два раза той же смесью новыми порциями объемом по 50 см^3. Экстракты объединяют и фильтруют на воронке с пористым стеклянным фильтром через слой безводного сульфата натрия толщиной 1 см, фильтрат собирают в отгонную колбу вместимостью 250 см^3.

Экстракт упаривают на ротационном испарителе под вакуумом досуха, остаток количественно переносят в мерный цилиндр вместимостью 100 см^3, ополаскивая колбу четырьмя порциями этилацетата объемом по 5 см^3. Объем содержимого в цилиндре доводят сначала до 25 см^3 этилацетатом, затем до 100 см^3 толуолом.

6.2 Колоночная хроматография

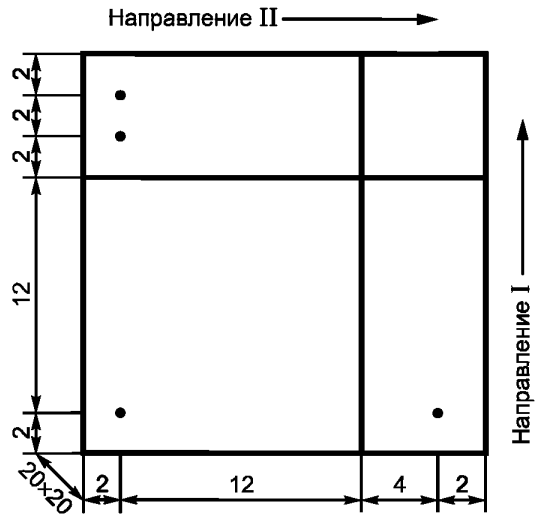
В основание колонки (4.1) помещают ватный тампон. В колонку вносят 25 см^3 толуола и

суспензию 15 г силикагеля (3.3) в 40 см^3 толуола. После оседания силикагеля в колонку вносят 15 г безводного сульфата натрия и дают растворителю стечь до верхней кромки насыпного слоя. В колонку вносят экстракт из исследуемой пробы, после чего растворителю дают стечь до верхней кромки насыпного слоя, элюат отбрасывают. В колонку вносят 200 см^3 элюирующего раствора (3.4) и проводят элюирование при скорости потока около 5 см^3/мин, элюат собирают в градуированный цилиндр. Собранный элюат упаривают приблизительно до объема 2 см^3.

Сконцентрированный элюат количественно переносят в пробирку вместимостью 20 см^3 с помощью четырех порций этилацетата объемом около 4 см^3 каждая и упаривают досуха в токе азота. Остаток немедленно растворяют в 0,5 см^3 этилацетата, так как патулин не стабилен.

6.3 Тонкослойная хроматография

Пластинки для ТСХ, предварительно покрытые силикагелем (4.4), активируют при температуре 110 °С в течение 2 ч. С помощью капиллярной пипетки или микрошприца на пластинку в точку, находящуюся на расстоянии 2 см от левого края и 2 см от нижнего края, наносят аликвотную часть очищенного экстракта из пробы (6.2) объемом 0,020 см^3. В точку, находящуюся на расстоянии 2 см от правого края и 2 см от нижнего края пластинки, наносят 0,005 см^3 стандартного раствора патулина (3.5). В точку, находящуюся на расстоянии 2 см от левого края и 2 см от верхнего края пластинки, наносят также 0,005 см^3 стандартного раствора патулина. В точку, находящуюся на расстоянии 2 см от левого края пластинки и 4 см от верхнего края пластинки, наносят 0,010 см^3 стандартного раствора патулина (см. рисунок 1).



Размеры в сантиметрах

Рисунок 1 — Двумерная тонкослойная хроматография

Хроматограмму развивают в направлении *I* (рисунок 1), используя подвижную фазу бензол/метанол/уксусная кислота (3.2), до прохождения фронтом растворителя расстояния 14 см. Пластинку вынимают из камеры, высушивают на воздухе, после чего развивают хроматограмму в направлении *II* (рисунок 1), используя подвижную фазу толуол/этилацетат/муравьиная кислота (3.2), до прохождения фронтом растворителя расстояния 14 см. Пластинку вынимают из камеры и высушивают при комнатной температуре. Пластинку опрыскивают раствором гидрохлорида МБТГ (3.6), после чего высушивают в течение 15 мин в сушильном шкафу (4.5) при температуре 130 °С.

6.4 Определение количества патулина в экстракте

Количество патулина в экстракте определяют сравнением интенсивности флюоресценции пятна патулина из экстракта с пятнами патулина из стандартного раствора при облучении пластинки длинноволновым ультрафиолетовым светом. Пятно патулина из экстракта ищут на пересечении перпендикулярных линий, соединяющих пятна патулина из стандартного раствора. Если интенсивность флюоресценции пятна патулина из 0,020 см^3 экстракта выше интенсивности флюоресценции пятен патулина из стандартного раствора, экстракт разводят этилацетатом и повторяют процедуру

ТСХ-анализа по 6.3. Если интенсивность флюоресценции пятна патулина из экстракта сравнима с интенсивностью флюоресценции одного из пятен патулина из стандартного раствора, то концентрация патулина в анализируемой пробе составляет 25 мкг/дм^3 либо 50 мкг/дм^3 соответственно.

При проведении анализа описанным методом достигается полное отделение патулина от оксиметилфурфурола (ОМФ), поэтому последний не влияет на результаты анализа.

7 Обработка результатов

Содержание патулина в продукте ρ_p, мкг/дм^3, вычисляют по формуле

$$\rho_p = \frac{V_2\,\rho_{ps}\,V_0}{50\,V_1} \cdot 10^3\ , \qquad (2)$$

где V_0 — конечный объем, до которого доведен очищенный экстракт, см^3;

V_1 — объем экстракта из пробы, нанесенный на пластинку, см^3;

V_2 — объем стандартного раствора патулина (3.5), соответствующий пятну той же интенсивности флюоресценции, что и пятно патулина из экстракта, см^3;

ρ_{ps} — концентрация патулина в стандартном растворе, мкг/ см^3;

50 — объем пробы, взятый для экстракции, см^3.

8 Точность метода

8.1 Сходимость результатов

$$r = 33{,}4 \text{ мкг/дм}^3;\ s_r = 29{,}4 \text{ мкг/дм}^3,$$

где r — предел сходимости;

s_r — среднее квадратическое отклонение сходимости.

8.2 Воспроизводимость результатов

$$R = 41{,}0 \text{ мкг/дм}^3;\ s_r = 35{,}8 \text{ мкг/дм}^3.$$

где R — предел воспроизводимости;

s_r — среднее квадратическое отклонение воспроизводимости.

9 Протокол испытаний

В протоколе испытаний указывают:

- метод испытаний;
- результат испытаний;
- окончательный результат с оценкой сходимости, если была проверена сходимость результатов.

Также следует отметить особенности проведения испытаний, не указанные в настоящем стандарте или рассматриваемые как несущественные, с побочными обстоятельствами, способными повлиять на результат испытаний.

Протокол испытаний должен содержать информацию, необходимую для полной идентификации образца.

УДК 664.863.001.4:006.354 ОКС 67.160.20 Н59 ОКСТУ 9109

Ключевые слова: яблочный сок, концентрированный яблочный сок, напитки, содержащие яблочный сок, патулин, определение содержания, тонкослойная хроматография

Редактор *М.И. Максимова*
Технический редактор *Н.С. Гришанова*
Корректор *М.С. Кабашова*
Компьютерная верстка *В.И. Грищенко*

Подписано в печать 18.08.2008. Формат 60×84$^{1}/_{8}$. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная. Усл. печ. л. 0,93.
Уч.-изд. л. 0,57. Тираж 89 экз. Зак. 1059.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru