МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ЗЕРНОВОЕ СЫРЬЕ, КОМБИКОРМА

Метод определения патулина

ГОСТ 28396—89

Grain raw material, mixed fodders.
Method for determination of patulin

ОКСТУ 9296

Дата введения 01.07.90

Настоящий стандарт распространяется на фуражное зерно, продукты его переработки, комбикорма и устанавливает метод определения патулина.

Сущность метода заключается в экстракции патулина из исследуемой пробы корма хлороформ — метанолом, очистке экстракта колоночной хроматографией с последующим полуколичественным определением его концентрации методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) путем визуального сравнения пятен.

Минимальный уровень обнаружения патулина 10 нг.

Минимальный открываемый уровень метода 100 мкг·кг$^{-1}$.

Извлечение = 90 %.

1. ОТБОР ПРОБ

Отбор проб — по ГОСТ 12430, ГОСТ 13496.0 и ГОСТ 13586.3.

2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

Аппликатор слоев.
Камера хроматографическая.
Микрошприцы вместимостью 10—50 мм^3 с градуировкой 1 мм^3.
Пластинки стеклянные размером 200 × 200 мм.
Пульверизатор для жидкостей.
Гомогенизатор (измельчитель лабораторный).
Сито, обеспечивающее получение фракции не более 2 мм.
Источник УФ-излучения с длиной волны 330—360 нм.
Аппарат для встряхивания.
Спектрофотометр, обеспечивающий измерение в области длин волн 250—400 нм.
Шкаф сушильный, обеспечивающий регулирование температуры до 150 °С.
Испаритель вакуумный роторного типа.
Весы технические с погрешностью взвешивания не более 100 мг.
Весы аналитические с погрешностью взвешивания не более 0,1 мг.
Воздухонагреватель (фен).
Пульверизатор для жидкости стеклянный.
Баня водяная, обеспечивающая регулирование температуры до 100 °С.
Насос водоструйный или другой вакуумный насос.
Колонка хроматографическая с краном, внутренним диаметром 20 мм и длиной 300 мм.
Стакан В-1—250 ТСХ по ГОСТ 25336.

gost.e-ecolog.ru

Воронка Бюхнера диаметром 10 см с колбой для отсасывания по ГОСТ 9147.

Колбы Эрленмейера с притертой пробкой КН-1—250—14/23 ТС по ГОСТ 25336 и КН-1—1000—14/23 ТС по ГОСТ 25336.

Эксикатор 2—290 по ГОСТ 25336.

Воронки стеклянные 12—36—80 ХС и В-75—140 ХС по ГОСТ 25336.

Колба мерная К1—100—2 по ГОСТ 1770.

Цилиндры 1—25, 50, 100 по ГОСТ 1770.

Пипетки 2—1, 5, 10, 20 по нормативно-технической документации.

Колба круглодонная с притертой пробкой К-1—250—29/32 ТС по ГОСТ 25336.

Колба Бунзена вместимостью 500 $см^3$.

Колба остродонная с притертой пробкой 0—25—14/23 ТС по ГОСТ 25336.

Фильтры бумажные диаметром 7 и 10 см, со средней скоростью пропускания.

Вата стеклянная.

Ангидрид уксусной кислоты по ГОСТ 5815.

Ацетон по ГОСТ 2603.

Кислота муравьиная по ГОСТ 5848 с массовой долей 85—90 %.

Бензол по ГОСТ 5955.

Хлороформ по ГОСТ 20015.

о-Дианизидин, раствор; готовят следующим образом: растворяют 0,2 г *о*-дианизидина в 5 $см^3$ муравьиной кислоты.

Эфир диэтиловый.

Эфир уксусноэтиловый.

Спирт этиловый по ГОСТ 5962.

Калия перманганат по ГОСТ 20490, раствор с массовой долей 1,5 %; готовят следующим образом: 1,5 г $KMnO_4$ растворяют в воде и доводят объем до 100 $см^3$.

Силикагель для колоночной хроматографии, готовят следующим образом: 80 г силикагеля 60 с размером частиц от 0,63 до 0,20 мм сушат в течение 1 ч при 105 °С, после остывания смешивают с 20 $см^3$ воды и встряхивают в закрытом сосуде в течение 2 ч.

Силикагель для тонкослойной хроматографии, пластинки «Силуфол».

Метанол по ГОСТ 6995.

Натрия сульфат безводный по ГОСТ 4166.

Пиридин по ГОСТ 13647.

Кислота соляная по ГОСТ 857, раствор с массовой долей 10 %.

Толуол по ГОСТ 5789.

Детергента раствор.

н-гексан.

Осушитель для эксикатора, нейтральный, например синий гель.

Патулин, аналитический стандарт.

Азот или другой инертный газ.

3. ПОДГОТОВКА К ИСПЫТАНИЮ

3.1. Приготовление хроматографической колонки

В хроматографическую колонку на пористое стеклянное дно или стеклянную вату вносят 15 г силикагеля со смесью бензол-уксусный эфир в соотношении 3:1 по объему. После оседания силикагеля излишку растворителя дают стечь, следя за тем, чтобы поверхность стационарной фазы оставалась покрытой растворителем.

3.2. Подготовка пластинок для тонкослойной хроматографии

Тщательно моют пластинки детергентом, обмывают последовательно проточной водой, затем дистиллированной водой и этанолом и сушат на воздухе. С помощью аппликатора наносят на пластинки равномерным слоем суспензию силикагеля в воде из расчета 35 г силикагеля в 70 $см^3$ воды для 5 пластинок. Толщина слоя должна быть 0,5 мм. После воздушной сушки пластинки активируют в сушильном шкафу при 110 °С в течение 1 ч и хранят в эксикаторе над нейтральным осушителем.

3.3. Приготовление растворителей для тонкослойной хроматографии

Для проведения анализа готовят системы растворителей следующего состава:

I. Толуол — уксусноэтиловый эфир-муравьиная кислота в объемных соотношениях 50:40:10.

II. Хлороформ-ацетон в объемных соотношениях 90:10.

III. Хлороформ-гексан-ацетон в объемных соотношениях 71:16:13.

IV. Бензол-метанол-уксусноэтиловый эфир в объемных соотношениях 96:4:1.

V. Эфир диэтиловый.

3.4. Подготовка хроматографической камеры

В хроматографическую камеру вносят систему растворителя по п. 3.3. Толщина слоя приблизительно 8 мм. Заднюю стенку хроматографической камеры облицовывают фильтровальной бумагой, пропитанной растворителем.

3.5. Приготовление камеры для хлорирования

В хроматографическую камеру вносят 25 см^3 соляной кислоты и 25 см^3 раствора перманганата калия и смешивают.

При этом крышка должна быть закрытой. Кроме того, в камеру ставят стеклянный предмет (например чашку Петри) для того, чтобы имелась повышенная площадка, на которую можно помещать ТСХ-пластинку, не погружая ее в жидкость. Камеру готовят непосредственно перед проведением испытания.

3.6. Приготовление стандартного раствора патулина

Рабочий стандартный раствор патулина готовят из основного раствора. Основной раствор, содержащий 10 мкг/см^3 патулина, готовят следующим образом: 1,0 мг патулина растворяют хлороформом и доводят объем до 100,0 см^3.

Концентрацию патулина в основном растворе контролируют при помощи спектрофотометра. Для этого 5,0 см^3 основного раствора выпаривают досуха в вакуумном испарителе под азотом при 30—35 °С, сразу растворяют остаток в 5,0 см^3 этанола и измеряют поглощение основного раствора и этанола с толщиной поглощающего свет слоя 0,5 см при длине волны 275 нм.

Концентрацию патулина (C), мкг/см^3, вычисляют по формуле

$$C = \frac{A \cdot M \cdot 1000 \cdot K}{\varepsilon \cdot D},$$

где A — поглощение раствора патулина на длине волны 275 нм;

M — молярная масса патулина, г/моль, равная 154;

K — калибровочный коэффициент спектрофотометра: от 0,95 до 1,05;

ε — молярный коэффициент поглощения патулина при длине волны 275 нм, равный 14600;

D — длина оптического пути, см.

Стандартный раствор, содержащий 2 мкг/см^3 патулина, готовят следующим образом: 20,0 см^3 основного раствора разбавляют хлороформом до 100,0 см^3.

Основной и стандартный растворы патулина хранят в темной посуде при 4 °С.

3.7. Подготовка проб

Исследуемый образец корма измельчают, тщательно перемешивают и пропускают через сито.

4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ

4.1. Получение экстракта

10,0 г подготовленной пробы переносят в колбу Эрленмейера вместимостью 250 см^3, добавляют 80 см^3 хлороформа и 10 см^3 метанола, закрывают колбу и встряхивают при комнатной температуре в аппарате для встряхивания в течение 1 ч. Полученный экстракт фильтруют через воронку Бюхнера, остаток трижды промывают порциями по 25 см^3 хлороформа. Объединенные хлороформные экстракты смешивают с безводным сульфатом натрия в количестве около 15 г и оставляют в закрытой колбе на 1 ч, периодически встряхивая. Затем сульфат натрия отделяют через складчатый фильтр и, во избежание потерь экстракта, сульфат натрия промывают дважды порциями по 10 см^3 хлороформа. Затем в круглодонной колбе в вакуумном испарителе экстракт выпаривают досуха при 40 °С.

Если в экстракте содержатся незначительные количества примесей, то остаток растворяют в 1 см^3 хлороформа и непосредственно проводят тонкослойно-хроматографические определения. При наличии больших количеств примесей проводят очистку экстракта колоночной хроматографией.

4.2. Очистка экстракта

Концентрированный экстракт сразу же растворяют в 10 см^3 смеси бензола и уксусноэтилового эфира в объемном соотношении 3:1. Полученный раствор вносят в хроматографическую колонку с силикагелем. Необходимая скорость прохождения экстракта по колонке обеспечивается при скорости стекания, равной четырем каплям в секунду. Затем через слой силикагеля, едва покрытый жидкостью, с такой же скоростью пропускают последовательно порциями 300 см^3 смеси бензола с уксусноэтиловым эфиром в соотношении 3:1. Первые 50 см^3 смеси после выхода из колонки отбрасывают. Последующие 250 см^3 смеси, содержащей патулин, собирают и выпаривают в остродонной колбе при 40 °С в вакуумном испарителе.

4.3. Обнаружение патулина с помощью тонкослойной хроматографии

4.3.1. К выпаренному досуха экстракту добавляют сразу 1 см^3 хлороформа.

На пластинку для ТСХ наносят на расстоянии 1,5 см от нижнего края и 1,5 см от бокового края один раз 5 мм^3 и дважды по 10 мм^3 экстракта и по 5, 10, 30 и 50 мм^3 стандартного раствора патулина, что соответствует 10, 20, 40, 60 и 100 нг патулина. На одно пятно, содержащее 10 мм^3 экстракта, дополнительно наносят 20 мм^3 стандартного раствора (внутренний стандарт).

Пластинку помещают в хроматографическую камеру с системой I и проявляют до подъема системы на 10 см от линии старта. Затем пластинку извлекают из камеры и сушат при комнатной температуре.

4.3.2. Высушенную пластинку помещают на 5 мин в камеру для хлорирования, затем на 5 мин в вытяжной шкаф для того, чтобы испарился хлор, и опрыскивают из пульверизатора раствором *о*-дианизидина. Через 15 мин проводят детекцию в УФ-свете под фильтром. Патулин выявляется на хроматограмме в виде желто-зеленого флюоресцирующего пятна, при этом значение фактора удержания равно 0,5 при использовании растворителя I.

Если в области *Rf* патулина появляются нежелательные пятна, покрывающие патулин, то их отделяют, используя систему растворителя II или проводя двухмерную хроматографию по п. 4.4.1.

4.4. Подтверждение наличия патулина

В случае обнаружения на хроматограмме желто-зеленых флюоресцирующих пятен, имеющих то же значение *Rf*, что и стандартный раствор, а следовательно, свидетельствующих о наличии патулина, полученный результат подтверждают проведением двумерной хроматографии и (или) образованием производных. Такое подтверждение необходимо в связи с тем, что различные содержащиеся в растениях соединения, например гидрометилфурфурол, ведут себя подобно патулину. Если желто-зеленые пятна на хроматограмме исчезают быстрее, чем стандартный раствор, то это указывает на вероятность отсутствия в исследуемом материале патулина.

4.4.1. *Подтверждение наличия патулина с помощью двухмерной тонкослойной хроматографии*

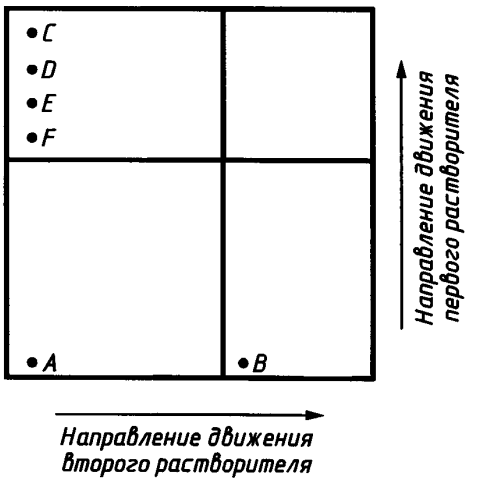
На точку *А* (см. чертеж) обеих пластинок помещают от 5 до 10 мм^3 исследуемого экстракта. Объем зависит от концентрации патулина, а также от содержания нежелательных примесей в экстракте.

Кроме того, на точку *С* пластинки наносят 10 мм^3, на точки *D* и *В* — 20 мм^3, на точку *Е* — 30 мм^3 и на точку *А* — 50 мм^3 стандартного раствора.

На вторую пластинку наносят одинаковые объемы экстракта и стандартного раствора, как описано для первой пластинки. В отличие от первой пластинки на точку *А* второй пластинки дополнительно наносят 20 мм^3 стандартного раствора (внутренний стандарт).

Точка *А* — стартовая точка экстракта; точки *В* — *F* — стартовые точки стандартного раствора патулина.

Пластинки проявляют в первом направлении движения с помощью растворителя I (*Rf* патулина 0,5), а после высушивания во втором направлении с помощью растворителя III (*Rf* патулина 0,2).



При отрицательном результате процесс разделения элюирования повторяют, используя растворители IV (*Rf* патулина 0,1) и V (*Rf* патулина 0,65). Детекцию проводят по п. 4.3.2. При этом пластинки, проявленные с помощью растворителей II, III, IV и V, перед помещением в камеру для хлорирования обрабатывают из пульверизатора муравьиной кислотой.

При наличии патулина его находят в точке пересечения условных линий, идущих параллельно к данному фронту растворителя через пятна стандарта первого и второго направлений движения растворителей.

4.4.2. *Подтверждение путем образования производных*

В остродонную колбу вместимостью 25 см^3 переносят 0,2 см^3 раствора экстракта в хлороформе, полученного по п. 4.3.1, добавляют 0,05 см^3 смеси ангидрида уксусной кислоты и пиридина в объемном соотношении 9:1 и выдерживают в водяной бане в течение 10 мин при температуре 50 °С. Затем ацетилируют смесь, выпаривают в вакуумном испарителе при 40 °С, к экстракту добавляют 0,2 см^3 хлороформа. Такую же процедуру повторяют с 0,2 см^3 стандартного раствора патулина.

Проводят одномерное хроматографическое разделение дериватизированного экстракта, при помощи растворителя I или двумерное — при помощи растворителей I и III или IV и V.

Для сравнения пятен используют дериватизированный стандарт патулина. Детекцию проводят по п. 4.3.2. Для этого перед помещением в камеру для хлорирования пластинку опрыскивают из пульверизатора муравьиной кислотой.

При наличии патулина в экстракте после ацетилирования пятно патулина на хроматограмме должно исчезать и появиться новое пятно с желтой флюоресценцией, имеющее для систем растворителей I, III, IV, V следующие значения Rf: 0,70; 0,65; 0,50 и 0,90 соответственно.

5. ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1. При обнаружении патулина в экстракте его количество в исследуемом образце определяют путем сравнения пятна в образце с пятном патулина стандарта.

Содержание патулина (X), мкг·кг$^{-1}$, вычисляют по формуле

$$X = \frac{V_W \cdot c \cdot V_к}{V_e \cdot m},$$

где V_W — объем стандартного раствора патулина, имеющего при визуальной оценке пятен ту же самую флюоресценцию, что и проба, см^3;

c — концентрация патулина в стандартном растворе, мкг/см^3;

$V_к$ — окончательный объем раствора, используемый для испытания экстракта, см^3;

V_e — объем нанесенного на пластинку испытуемого раствора, соответствующего при визуальной оценке пятен стандартному раствору, см^3;

m — масса пробы, соответствующая объему очищенного экстракта, г.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, допустимые расхождения отклонения между которыми не должны превышать 15 % их среднего арифметического значения.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. **РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН Всесоюзным ордена Дружбы народов научно-исследовательским институтом ветеринарной санитарии**

   РАЗРАБОТЧИКИ

   А.Н. Леонов, Г.П. Кононенко

2. **УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Постановлением Государственного комитета СССР по управлению качеством продукции и стандартам от 21.12.89 № 3947**

3. **Стандарт полностью соответствует СТ СЭВ 6540—88**

4. **ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ**

5. **ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

Обозначение НТД, на который дана ссылка	Номер раздела
ГОСТ 857—95	2
ГОСТ 1770—74	2
ГОСТ 2603—79	2
ГОСТ 4166—76	2
ГОСТ 5789—78	2
ГОСТ 5815—77	2
ГОСТ 5848—73	2
ГОСТ 5955—75	2
ГОСТ 5962—67	2
ГОСТ 6995—77	2
ГОСТ 9147—80	2
ГОСТ 12430—66	1
ГОСТ 13496.0—80	1
ГОСТ 13586.3—83	1
ГОСТ 13647—78	2
ГОСТ 20015—88	2
ГОСТ 20490—75	2
ГОСТ 25336—82	2

6. **Ограничение срока действия снято по протоколу № 4—93 Межгосударственного Совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ИУС 4—94)**

7. **ПЕРЕИЗДАНИЕ**

gost.e-ecolog.ru