

**ЗЕРНОВОЕ СЫРЬЕ, КОМБИКОРМА****Метод определения патулина**Grain raw material, mixed fodders.  
Method for determination of patulin**ГОСТ  
28396—89**

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 обнаруживаемый уровень метода 100 мкг·кг<sup>-1</sup>.

Извлечение = 90 %.

**1. ОТБОР ПРОБ**

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

**2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ**

Апликатор слоев.

Камера хроматографическая.

Микрошприцы вместимостью 10—50 мм<sup>3</sup> с градуировкой 1 мм<sup>3</sup>.

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.

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<sup>3</sup>.

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.

*o*-Дианизидин, раствор; готовят следующим образом: растворяют 0,2 г *o*-дианизидина в 5 см<sup>3</sup> 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<sub>4</sub> растворяют в воде и доводят объем до 100 см<sup>3</sup>.

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<sup>3</sup> 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.

*n*-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 излишек 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<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> соляной кислоты и 25 см<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> патулина, готовят следующим образом: 1,0 мг патулина растворяют хлороформом и доводят объем до 100,0 см<sup>3</sup>.

Концентрацию патулина в основном растворе контролируют при помощи спектрофотометра. Для этого 5,0 см<sup>3</sup> основного раствора выпаривают досуха в вакуумном испарителе под азотом при 30—35 °С, сразу растворяют остаток в 5,0 см<sup>3</sup> 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<sup>3</sup>, вычисляют по формуле

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

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;

$\epsilon$  — молярный коэффициент поглощения патулина при длине волны 275 нм, равный 14600;

$D$  — длина оптического пути, см.

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

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<sup>3</sup>, добавляют 80 см<sup>3</sup> хлороформа и 10 см<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> смеси бензола с уксусноэтиловым эфиром в соотношении 3:1. Первые 50 см<sup>3</sup> смеси после выхода из колонки отбрасывают. Последующие 250 см<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> 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<sup>3</sup> и дважды по 10 мм<sup>3</sup> экстракта и по 5, 10, 30 и 50 мм<sup>3</sup> стандартного раствора патулина, что соответствует 10, 20, 40, 60 и 100 нг патулина. На одно пятно, содержащее 10 мм<sup>3</sup> экстракта, дополнительно наносят 20 мм<sup>3</sup> 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 *o*-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 *R<sub>f</sub>* 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 *R<sub>f</sub>*, 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 двумерной тонкослойной хроматографии

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

Кроме того, на точку *C* пластинки наносят 10 мм<sup>3</sup>, на точки *D* и *B* — 20 мм<sup>3</sup>, на точку *E* — 30 мм<sup>3</sup> и на точку *A* — 50 мм<sup>3</sup> стандартного раствора.

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

Точка *A* — стартовая точка экстракта; точки *B* — *F* — стартовые точки стандартного раствора патулина.

Пластинки проявляют в первом направлении движения с помощью растворителя I (*R<sub>f</sub>* патулина 0,5), а после высушивания во втором направлении с помощью растворителя III (*R<sub>f</sub>* патулина 0,2).



При отрицательном результате процесс разделения элюирования повторяют, используя растворители IV ( $R_f$  патулина 0,1) и V ( $R_f$  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<sup>3</sup> переносят 0,2 см<sup>3</sup> раствора экстракта в хлороформе, полученного по п. 4.3.1, добавляют 0,05 см<sup>3</sup> 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 ацетируют смесь, выпаривают в вакуумном испарителе при 40 °С, к экстракту добавляют 0,2 см<sup>3</sup> хлороформа. Такую же процедуру повторяют с 0,2 см<sup>3</sup> 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  $R_f$ : 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<sup>-1</sup>, вычисляют по формуле

$$X = \frac{V_w \cdot c \cdot V_k}{V_e \cdot m},$$

где  $V_w$  — объем стандартного раствора патулина, имеющего при визуальной оценке пятен ту же самую флюоресценцию, что и проба, см<sup>3</sup>;

$c$  — концентрация патулина в стандартном растворе, мкг/см<sup>3</sup>;

$V_k$  — окончательный объем раствора, используемый для испытания экстракта, см<sup>3</sup>;

$V_e$  — объем нанесенного на пластинку испытуемого раствора, соответствующего при визуальной оценке пятен стандартному раствору, см<sup>3</sup>;

$m$  — 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