



РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ

Міністэрства аховы здароўя

ГАЛОЎНЫ ДЗЯРЖАЎНЫ
САЇТАРНЫ ЎРАЧ
РЭСПУБЛІКІ БЕЛАРУСЬ

220048, г. Мінск, вул. Мяснікова, 39
факс 220-64-59 E-mail: Vkluchenovich@belcmt.by

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ

Министерство здравоохранения

ГЛАВНЫЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
САНИТАРНЫЙ ВРАЧ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

220048, г. Минск, ул. Мясникова, 39
факс 220-64-59 E-mail: Vkluchenovich@belcmt.by

«22» августа 2005 г. № _____

На № _____

ПОСТАНОВЛЕНИЕ № 116

Об утверждении Сборника инструкций
4.1.10-15-28-2005 – 4.1.10-15-29-2005
«Определение содержания гистамина
в рыбопродуктах»

В целях исполнения Закона Республики Беларусь «О санитарно-эпидемическом благополучии населения» в редакции от 23 мая 2000 года (Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь, 2000 г, № 52, 2/172) постановляю:

1. Утвердить прилагаемый Сборник инструкций 4.1.10-15-28-2005 – 4.1.10-15-29-2005 «Определение содержания гистамина в рыбопродуктах» и ввести его в действие на территории Республики Беларусь с 02 января 2006 г.

2. С момента введения в действие на территории Республики Беларусь Сборника инструкций 4.1.10-15-28-2005 – 4.1.10-15-29-2005 «Определение содержания гистамина в рыбопродуктах» не применять на территории Республики Беларусь Санитарные правила и нормы «Временные гигиенические нормативы и метод определения содержания гистамина в рыбопродуктах» № 42-123-4083-86, утвержденные заместителем Главного государственного санитарного врача СССР 27 марта 1986 года, и дополнение к Санитарным правилам и нормам «Временные гигиенические нормативы и метод определения содержания гистамина в рыбопродуктах» № 42-123-4083-86, утвержденное заместителем Главного государственного санитарного врача СССР 31 марта 1987 года.

3. Главным государственным санитарным врачам областей и г.Минска довести данное постановление до сведения всех заинтересованных и установить контроль за его выполнением.

М. И. Римжа

УТВЕРЖДЕНО
 Постановление
 Главного государственного
 санитарного врача
 Республики Беларусь
 от 22 августа 2005 № 116

Инструкция 4.1.10-15-29-2005
 «ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГИСТАМИНА
 В РЫБОПРОДУКТАХ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ»

1. Принцип метода

В основе колориметрического метода определения гистамина лежит измерение величины абсорбции окрашенного производного, полученного при взаимодействии гистамина с диазореактивом.

Предел обнаружения метода — 10 мг/кг, относительное стандартное отклонение при определении гистамина в интервале концентраций — 20-175 мг/кг изменяется от 0,08 до 0,25.

Степень извлечения добавленного к образцу стандарта гистамина — 94-99%.

2. Средства измерений, вспомогательное оборудование и реактивы

При выполнении измерений должны применяться следующие средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы и материалы:

Средства измерений

Колориметр фотоэлектрический со свето-фильтром с $\lambda = 490 \pm 10$ нм или спектрофотометр СФ-26	
Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г, допускаемая погрешность взвешивания $\pm 0,001$ г	ГОСТ 24104-2001
Весы лабораторные общего назначения 3-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 1 кг, допускаемая погрешность взвешивания $\pm 0,1$ г	ГОСТ 24104-2001

Вспомогательное оборудование

Баня водяная	
Мясорубка	ГОСТ 4025-95
Микроразмельчитель тканей РТ-2	

Холодильник бытовой	
Шкаф лабораторный сушильный	
Электроплитка бытовая	
Воронки В-100-150-ХС; В-35-50-ХС	ГОСТ 25336-82
Воронки делительные ВД-3-250-29/32 ХС	ГОСТ 25336-82
Колбы конические К _Н -1-100-29/32 ТС	ГОСТ 25336-82
Колбы мерные 1-100-2 или 2-100-2	ГОСТ 1770-74
Пипетки 4-1-1 или 5-1-1, 7-1-5 или 7-2-5; 7-1-10 или 7-2-10	ГОСТ 20292-74
Пробирки мерные П-2-10 или П-2-15	
Термометр 0 — 100° С	
Колбы конические плоскодонные на 50 мл с НШ 14, на 100 мл с НШ 29	ГОСТ 23932-90Е
Цилиндры мерные 1-50 или 2-50	ГОСТ 1770-74

Материалы

Бумага фильтровальная	ГОСТ 12026-76
-----------------------	---------------

Реактивы

н-Бутанол, ч.	ГОСТ 6006-78
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
Гистамин или гидрохлорид гистамина	
Кислота соляная, химически чистая х.ч., раствор 3,75 г/дм ³ (0,1 н раствор)	ГОСТ 3118-77
Кислота трихлоруксусная (5%-ный раствор)	ТУ 6-09-1926-77
Натрий азотистокислый, ч.д.а., раствор 50 г/дм ³	ГОСТ 4197-74
Натрия гидроокись, ч.д.а., раствор 200 г/дм ³ (5 н раствор)	ГОСТ 4328-77
Натрий серноокислый безводный, х.ч., прокаленный	ГОСТ 4166-76
Натрий углекислый, х.ч. (4%-ный раствор)	ГОСТ 83-79
Пара-нитроанилин, ч.д.а.	
Этилацетат, ч.д.а.	ГОСТ 22300-76

Могут быть использованы другие средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы по техническим и метрологическим характеристикам не уступающие указанным в настоящей Инструкции, не влияющие на результат измерения.

3. Требования безопасности

Проведение измерений должно выполняться согласно требованиям правил безопасной работы в химических лабораториях и инструкций по эксплуатации приборов.

Требования к квалификации оператора

К выполнению измерений могут быть допущены лица, имеющие высшее или среднее специальное образование, медицинское или техническое, прошедшие обучение работе на фотоэлектрическом колориметре, изучившие правила безопасной работы в химических лабораториях и настоящую Инструкцию.

Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории согласно ГОСТ 15150–69 «Машины, приборы и другие технические изделия. Исполнения для разных климатических районов. Категории, условия эксплуатации, хранения и транспортирования в части воздействия климатических факторов внешней среды» должны быть соблюдены следующие условия:

температура воздуха $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$;
атмосферное давление 84,0-106,7 кПа (630-800 мм рт. ст.);
влажность воздуха не более 80% при температуре 25°C .

Выполнение измерений на фотоэлектрическом колориметре проводят в условиях, рекомендуемых технической документацией по прибору.

4. Подготовка к проведению измерений

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: подготовка измерительной и вспомогательной аппаратуры, посуды, приготовление растворов, построение градуировочного графика, подготовка проб к измерению.

Подготовка фотоэлектроколориметра к работе

Подготовку прибора к работе, его включение и выведение на рабочий режим осуществляют в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

Подготовка лабораторной посуды

Новую или сильно загрязненную лабораторную посуду (колбы, пипетки, стаканы цилиндры, после мойки в растворе любого моющего средства промывают водопроводной водой, а затем дистиллированной).

Приготовление реактивов

Приготовление раствора пара-нитроанилина

Пара-нитроанилин очищают путем перекристаллизации в воде. Для этого его растворяют в горячей дистиллированной воде и охлаждают раствор до комнатной температуры. Выпавшие кристаллы отфильтровывают и

высушивают при температуре 80°C в течение 10-15 минут. 0,1 г пара-нитроанилина растворяют в 100 см³ 0,1 н соляной кислоты. Раствор хранят в холодильнике до момента употребления.

Приготовление diaзореактива

Diazореактив получают непосредственно перед использованием путем смешивания 10 см³ раствора 1 г/дм³ пара-нитроанилина в 0,1 н соляной кислоте и 1 см³ раствора 50 г/дм³ азотистокислого натрия и охлаждают до 0°C.

Приготовление н-бутанола, насыщенного водой

Для приготовления н-бутанола, насыщенного водой, встряхивают 50 см³ н-бутанола и 20 см³ дистиллированной воды в делительной воронке. После разделения фаз отделяют верхний бутанольный слой.

Приготовление азотистокислого натрия

50 г азотистокислого натрия переносят в мерную колбу емкостью 1000 см³, растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки дистиллированной водой.

5. Отбор проб и их хранение

Отбор проб производится по ГОСТ 7631-85 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Правила приемки, органолептические методы оценки качества, методы отбора проб для лабораторных испытаний» и по ГОСТ 87.56.0-70 «Продукты пищевые консервированные. Отбор проб и подготовка их к испытанию».

Образцы доставляют в лабораторию сразу же после отбора пробы. В случае длительной транспортировки (более 1 часа) рыба-сырец должна транспортироваться в охлажденном состоянии, а мороженая – в замороженном состоянии. Исследование образцов должно проводиться в день доставки их в лабораторию. При отсутствии такой возможности образцы должны храниться при температуре не выше минус 8° С не более трех суток.

Доставка и хранение образцов консервов и другой продукции должны проводиться с соблюдением режимов, предусмотренных техническими нормативными правовыми актами.

6. Подготовка образца к исследованию

Рыбу, отобранную для исследования, размораживают, счищают от механических загрязнений и чешуи. Обмывание рыбы не допускается.

Для исследования крупной рыбы берут только мясо без кожи и костей. Для этого от рыбы отделяют голову и плавники, разрезают тушку по брюшку и удаляют все внутренности; разрезают продольным разрезом по спинке и удаляют позвоночник и, по возможности, все ребра, а мясо вместе с под-

кожным жиром тщательно соскабливают с кожи. Мелкую рыбу исследуют целиком.

При весе каждого неразделанного экземпляра рыбы свыше 500 г после разделки берут для дальнейшего измельчения только одну продольную половину рыбы.

При весе одной продольной половины рыбы свыше 1 кг ее разрезают на поперечные куски шириной 2-4 см и берут для анализа мясо от половины всего числа кусков через один.

Мелкую неразделанную рыбу или пробу мяса от крупной рыбы дважды пропускают, как можно быстрее, через мясорубку; фарш тщательно перемешивают и из разных мест отбирают навеску в соответствии с прописью избранного метода.

При исследовании консервов из рыб или морских животных из содержимого всех банок, выделенных в качестве среднего образца, после определения соотношения составных частей (жидкой и твердой) готовят одну общую пробу. Специи (лук, перец и другие) должны быть удалены из рыбы. Твердую часть консервов быстро пропускают два раза через мясорубку, смешивают с жидкой частью и растирают по частям в фарфоровой ступке до состояния однородной массы. Консервы, имеющие заливку, рассол, можно измельчать на гомогенизаторе. Из подготовленной таким образом пробы отбирают навески для последующих определений.

Средние образцы продукции сохраняются в холодильнике до конца анализа. В случае обнаружения гистамина в количестве выше установленной гигиенической нормы - до представления результатов исследований в соответствующие учреждения и принятия необходимых профилактических мер.

7. Экстракция

Навеску 10 г (с точностью до 0,01 г) приготовленного образца помещают в сосуд микроразмельчителя тканей, добавляют 25 см³ 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и перемешивают 5 минут. Полученную смесь переносят в плоскодонную коническую колбу на 100 см³, ополаскивают сосуд смесителя дважды 5-10-ю см³ 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и растворы объединяют. Колбу снабжают воздушным холодильником и выдерживают на водяной бане при 60° С 15 минут. Охлажденную смесь переносят количественно в цилиндр, доводят до 50 см³ 5%-ным раствором трихлоруксусной кислоты и фильтруют через складчатый бумажный фильтр (фильтрат 1).

8. Построение калибровочной кривой

Готовят стандартные растворы гистамина с концентрацией 5, 10, 20 и 40 мкг/см³ в 5%-ной трихлоруксусной кислоте.

Для приготовления основного раствора гистамина с концентрацией 40 мкг/см³ 4,0 мг гистамина помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, растворяют в 5 %-ной трихлоруксусной кислоте и доводят объем до метки. Рабочие растворы гистамина с концентрациями 20, 10, 5 мкг/см³ получают путем разбавления 5%-ным раствором трихлоруксусной кислоты. Основного раствора в 2, 4 и 8 раз соответственно. Основной раствор гистамина хранят в холодильнике неделю, рабочие растворы готовят в день проведения анализа.

5 см³ каждого стандартного раствора помещают в пробирки с притертыми пробками, добавляют 1 см³ 20% раствора гидроксида натрия и вносят в раствор при перемешивании безводный углекислый натрий до получения насыщенного раствора. Добавляют 5 см³ н-бутанола, насыщенного водой и энергично встряхивают пробирки в течение 30 секунд. После разделения фаз отбирают 2 см³ нижнего водного слоя, переносят в другую пробирку, добавляют 2 см³ 4%-ного раствора углекислого натрия и выдерживают 5 минут при 0°C. Приливают к охлажденному раствору 2 см³ холодного свежеприготовленного диазореактива, встряхивают и вновь выдерживают 5 минут при 0°C. Добавляют 4 см³ этилацетата и энергично встряхивают в течение 30 секунд. После разделения фаз сухой пипеткой отбирают верхний слой и переносят в пробирку, содержащую безводный сульфат натрия (раствор окрашенного производного в этилацетате должен быть прозрачным). Измеряют величину абсорбции раствора при 495 нм в кювете толщиной 1 см. В качестве раствора сравнения используют этилацетат. На основании полученных данных строится калибровочная кривая зависимости величины абсорбции от концентрации гистамина в растворе.

9. Проведение испытаний

5 см³ фильтрата 1, полученного, как описано в разделе 7 «Экстракция» настоящей Инструкции, помещают в пробирку и проводят процедуру, описанную в разделе 8 «Построение калибровочной кривой», начиная с добавления раствора гидроксида натрия.

Если образцы содержат гистамина более 200 мг/кг, необходимо разбавить полученный фильтрат 5%-ным раствором трихлоруксусной кислоты.

Для определения концентрации гистамина в экстракте используется калибровочная кривая.

10. Обработка результатов

Содержание гистамина в образце продукта X (в мг/кг) вычисляется по формуле:

$$X = \frac{c x V_1 x \Phi}{n}, \text{ где}$$

с — концентрация гистамина, найденная по калибровочной кривой, мкг/см³;
 V₁ — объем экстракта, см³ (50 см³);
 n — навеска образца продукта, г (10 г);
 Ф — фактор разбавления, который вычисляется по формуле:

$$\Phi = \frac{V + V_1}{V}, \text{ где}$$

V₁ — объем фильтрата 1, см³;

V — объем 5% трихлоруксусной кислоты, см³;

Вычисление проводят до целых единиц. За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение результатов трех параллельных определений. Допустимое расхождение между результатами параллельных определений не должно превышать 50% по отношению к среднему арифметическому значению.

11. Внутренний оперативный контроль качества

Внутренний оперативный контроль качества результатов контрольного химического анализа (сходимость, воспроизводимость, точность) осуществляют с целью получения оперативной информации о качестве анализов и принятия при необходимости оперативных мер по его повышению.

Контроль сходимости

Контролируемым параметром является относительная разбежка величины экстинкции при измерении трех параллельных проб градуировочного раствора. Контроль осуществляется при построении калибровочного графика, при периодическом контроле градуировочных коэффициентов, а также при выполнении измерений.

Результат контроля признается положительным при выполнении условия:

$$\frac{\epsilon_{\max} - \epsilon_{\min}}{\epsilon_{\text{ср}}} 100 \leq 15\%, \text{ где}$$

ε - экстинция – относительная плотность раствора;

ε_{ср} - среднее арифметическое значение относительной плотности раствора при измерении 3 параллельных проб градуировочного раствора.

Оперативный контроль точности

Периодичность контроля погрешности измерений зависит от количества рабочих измерений за контролируемый период и определяется планами контроля.

Образцами для контроля являются представительные пробы исследуемого пищевого продукта, к которым делают добавки в виде раствора. Отбирают 2 пробы и к одной из них делают добавку в виде раствора таким

образом, чтобы их содержание увеличилось по сравнению с исходным на 50—150 %. Каждую пробу анализируют в точном соответствии с прописью методики и получают результат анализа исходной рабочей пробы X и рабочей пробы с добавкой X^1 . Результаты анализа исходной рабочей пробы X и рабочей пробы с добавкой X^1 получают в одинаковых условиях, т. е. их получает один аналитик с использованием одного прибора, набора мерной посуды, одной партии реактивов и т. д.

Результаты контроля признаются удовлетворительными, если выполняется условие:

$$|X^1 - X - C| < K_d, \text{ где}$$

C - добавка к пробе в виде раствора с концентрацией, мкг/см³;

K_d - норматив оперативного контроля погрешности, мкг/см³.

При внешнем контроле ($P = 0,95$) принимают

$$K_d = \sqrt{\Delta_{x^1}^2 + \Delta_x^2}, \text{ где}$$

$\Delta_{x^1}^2$ и Δ_x^2 - характеристики погрешностей для исходной пробы и пробы с добавкой, мкг/см³.

$$\Delta_{x^1} = 0,165 X^1 \quad \text{и} \quad \Delta_x = 0,165 X$$

При внутрिलाбораторном контроле ($P=0,90$) принимают, что

$$K_d^1 = 0,84 K_d$$

При превышении оперативного контроля точности эксперимент повторяют. При повторном превышении указанного норматива выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля, и их устраняют.

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Настоящий Сборник инструкций подготовлен ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

2. Утвержден постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 22 августа 2005 г. № 116.

3. Введен взамен Санитарных правил и норм «Временные гигиенические нормативы и метод определения содержания гистамина в рыбопродуктах» № 42-123-4083-86, разработанных Главным санитарно-эпидемиологическим управлением Министерства здравоохранения СССР, Институтом питания Академии Медицинских Наук СССР, утвержденных заместителем Главного государственного санитарного врача СССР 27 марта 1986 года, и дополнения к ним, утвержденного заместителем Главного государственного санитарного врача СССР 31 марта 1987 года.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ