**Официальный мексиканский стандарт NOM-247-SSA1-2008 - Продукты и услуги. Зерновые и продукты из них. Зерновые, зерновая мука, манная и прочая крупа. Продукты питания на основе: зерновых, съедобных семян, муки, манной и прочей крупы или их смесей. Хлебобулочные изделия. Санитарно-пищевые положения и требования. Методы тестирования.**

На полях печать с национальным гербом, на которой написано: Мексиканские Соединенные Штаты.- Министерство Здравоохранения.

ОФИЦИАЛЬНЫЙ МЕКСИКАНСКИЙ СТАНДАРТ NOM-247-SSA1-2008 - ПРОДУКТЫ И УСЛУГИ. ЗЕРНОВЫЕ И ПРОДУКТЫ ИЗ НИХ. ЗЕРНОВЫЕ, ЗЕРНОВАЯ МУКА, МАННАЯ И ПРОЧАЯ КРУПА. ПРОДУКТЫ ПИТАНИЯ НА ОСНОВЕ: ЗЕРНОВЫХ, СЪЕДОБНЫХ СЕМЯН, МУКИ, МАННОЙ И ПРОЧЕЙ КРУПЫ ИЛИ ИХ СМЕСЕЙ. ХЛЕБОБУЛОЧНЫЕ ИЗДЕЛИЯ. САНИТАРНО-ПИЩЕВЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ И ТРЕБОВАНИЯ. МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ.

Я, МИГЕЛЬ АНХЕЛЬ ТОСКАНО ВЕЛАСКО, федеральный комиссар по защите от рисков для здоровья и председатель Национального консультативного комитета по стандартизации регулирования и развитию здравоохранения на основе статьи 39 часть XXI Основного закона о федеральном государственном управлении; ст. 4 Федерального закона об административном производстве; ст. 3 часть XXIV, статьи 13 раздел А, часть I и II, статьи 17-бис часть II и III, статьи 17-бис 2, 114, 115, часть VII, статьи 194 часть I, статьи 197, 199, 201, 205, 210, 212, 215 часть I, статьи 216 Общего закона о здравоохранении; статьи 38 часть II, статьи 40 часть I, II и XI, статьи 41, 43, 46, 47 часть III и IV Федерального закона о метрологии и стандартизации; статьи 28 Регламента Федерального закона о метрологии и стандартизации; ст. 1 часть VII, ст. 4, 8, 13, 15, 25, 30, 112, 113, 116, и пятой переходной Регламента санитарного контроля за продуктами и услугами; ст. 2, подпункт C, часть X и статьи 36 Внутреннего регламента Министерства здравоохранения; ст. 3 часть I, подпункт С и часть II, статьи 10 часть IV и VIII, и статьи 12 часть III Регламента Федеральной комиссии по защите от рисков для здоровья, разрешаю опубликовать в Официальном журнале Федерации Официальный мексиканский стандарт NOM-SSA1-2008 - Продукты и услуги. Зерновые и продукты из них. Зерновые, зерновая мука, манная и прочая крупа. Продукты питания на основе: зерновых, съедобных семян, муки, манной и прочей крупы или их смесей. Хлебобулочные изделия. Санитарно-пищевые положения и требования. Методы тестирования.

**УЧИТЫВАЯ**

Что в соответствии со статьей 46, часть I, Федерального закона о метрологии и стандартизации Подкомитет по продуктам и услугам представил в 2005 году Национальному консультативному комитету по стандартизации регулирования и развитию здравоохранения предварительный проект официального мексиканского стандарта.

Что 2 июня 2008 года в соответствии с соглашением Комитета и статьей 47, часть I, Федерального закона о метрологии и стандартизации был опубликован проект Официального мексиканского стандарта PROY-NOM-247-SSA1-2005 - Продукты и услуги. Зерновые и продукты из них. Зерновые, зерновая мука, манная и прочая крупа. Продукты питания на основе: зерновых, съедобных семян, муки, манной и прочей крупы или их смесей. Хлебобулочные изделия. Санитарно-пищевые положения и требования. Методы тестирования - в Официальном журнале Федерации, с тем чтобы в течение шестидесяти календарных дней после такой публикации заинтересованные стороны представили свои комментарии Национальному консультативному комитету по стандартизации регулирования и развитию здравоохранения.

Что ранее в Официальном журнале Федерации были опубликованы ответы на комментарии, полученные вышеупомянутым Комитетом, в соответствии со статьей 47, часть III, Федерального закона о метрологии и стандартизации.

Что в соответствии с вышеуказанными положениями, с одобрения Национального консультативного комитета по стандартизации регулирования и развитию здравоохранения, выдается следующее:

**ОФИЦИАЛЬНЫЙ МЕКСИКАНСКИЙ СТАНДАРТ NOM-247-SSA1-2008 - ПРОДУКТЫ И УСЛУГИ. ЗЕРНОВЫЕ И ПРОДУКТЫ ИЗ НИХ. ЗЕРНОВЫЕ, ЗЕРНОВАЯ МУКА, МАННАЯ И ПРОЧАЯ КРУПА. ПРОДУКТЫ ПИТАНИЯ НА ОСНОВЕ: ЗЕРНОВЫХ, СЪЕДОБНЫХ СЕМЯН, МУКИ, МАННОЙ И ПРОЧЕЙ КРУПЫ ИЛИ ИХ СМЕСЕЙ.**

**ХЛЕБОБУЛОЧНЫЕ ИЗДЕЛИЯ. САНИТАРНО-ПИЩЕВЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ И ТРЕБОВАНИЯ. МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ ПРЕДИСЛОВИЕ**

В пересмотре настоящего стандарта приняли участие следующие органы и учреждения:

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

Федеральная комиссия по защите от рисков для здоровья

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКИХ НАУК И ПИТАНИЯ “САЛЬВАДОР ЗУБИРАН”

АКЦИОНЕРНАЯ КОМПАНИЯ С ПЕРЕМЕННЫМ КАПИТАЛОМ PRODUCTOS ALIMENTICIOS LA MODERNA, S.A. DE C.V.

АКЦИОНЕРНАЯ КОМПАНИЯ С ПЕРЕМЕННЫМ КАПИТАЛОМ DEUTSCHE QUIMICA, S.A. DE C.V.

КОМПАНИЯ MUHLENCHEMIE GMBH

ООО С ПЕРЕМЕННЫМ КАПИТАЛОМ UNILEVER DE MEXICO, S. DE R.L. DE C.V.

АО С ПЕРЕМЕННЫМ КАПИТАЛОМ NESTLE, S.A. DE C.V.

ООО С ПЕРЕМЕННЫМ КАПИТАЛОМ KELLOGG COMPANY MEXICO, S. DE R.L. DE C.V.

АО С ПЕРЕМЕННЫМ КАПИТАЛОМ GRUPO ALTEX S.A. DE C.V.

АО С ПЕРЕМЕННЫМ КАПИТАЛОМ GRUPO TRIMEX S.A. DE C.V.

АО С ПЕРЕМЕННЫМ КАПИТАЛОМ MOLINO DE TRIGO EL PILAR, S.A. DE C.V.

АО С ПЕРЕМЕННЫМ КАПИТАЛОМ PROBST, S.A. DE C.V.

АО С ПЕРЕМЕННЫМ КАПИТАЛОМ DSM NUTRITIONAL PRODUCTS MEXICO, S.A. DE C.V.

НАЦИОНАЛЬНАЯ ПАЛАТА ПШЕНИЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

АО С ПЕРЕМЕННЫМ КАПИТАЛОМ GRUPO MAIZ INDUSTRIALIZADO, S.A. DE C.V.

АО С ПЕРЕМЕННЫМ КАПИТАЛОМ FABRICA DE HARINAS ELIZONDO, S.A. DE C.V.

НАЦИОНАЛЬНАЯ ПАЛАТА ХЛЕБОПЕКАРНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

НАЦИОНАЛЬНАЯ ПАЛАТА КУКУРУЗНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

МЕКСИКАНСКАЯ АССОЦИАЦИЯ ПРОМЫШЛЕННИКОВ ПЕЧЕНЬЯ И МАКАРОН

ООО С ПЕРЕМЕННЫМ КАПИТАЛОМ KRAFT FOODS DE MEXICO, S. DE R.L. DE C.V.

**СОДЕРЖАНИЕ**

**1.** ЦЕЛЬ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

**2.** ССЫЛКИ

**3.** ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**4.** УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

**5.** САНИТАРНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ
**5.1** ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

**5.2.** ЧАСТНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

**5.2.1** ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ЗЕРНОВЫХ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ПОТРЕБЛЕНИЯ ЧЕЛОВЕКОМ

**5.2.2** ЗЕРНОВАЯ МУКА, МАННАЯ И ПРОЧАЯ КРУПА.

**5.2.3** ПРОДУКТЫ ПИТАНИЯ НА ОСНОВЕ: ЗЕРНОВЫХ, СЪЕДОБНЫХ СЕМЯН, МУКИ, МАННОЙ И ПРОЧЕЙ КРУПЫ ИЛИ ИХ СМЕСЕЙ

**5.2.4** ХЛЕБОБУЛОЧНЫЕ ИЗДЕЛИЯ

**6.** ОТБОР ПРОБ

**7.** МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ

**8.** МАРКИРОВКА

**9.** ВНУТРЕННЯЯ И ВНЕШНЯЯ УПАКОВКА

**10.** СООТВЕТСТВИЕ МЕЖДУНАРОДНЫМ СТАНДАРТАМ

**11.** БИБЛИОГРАФИЯ

**12.** СОБЛЮДЕНИЕ СТАНДАРТА

**13.** СРОК ДЕЙСТВИЯ

**14.** ПРИЛОЖЕНИЯ СТАНДАРТА

Приложение А Стандарта: Пищевые добавки
Приложение В Стандарта: Отбор проб зерновых

Приложение C Стандарта: Методы тестирования

**1. Цель и область применения**

**1.1** Настоящий официальный мексиканский стандарт устанавливает санитарные положения и требования, которым должны соответствовать транспортировка и хранение зерновых, предназначенных для потребления человеком, а также процесс производства зерновой муки, манной и прочей крупы, продуктов, приготовленных из зерновых, съедобных семян, муки, манной и прочей крупы или их смесей и хлебобулочных изделий.

**1.2** Под действие настоящего стандарта не подпадают закуски и продукты питания на основе зерновых для младенцев и детей младшего возраста.

**1.3** Настоящий официальный мексиканский стандарт устанавливает питательные вещества, которые необходимо добавлять и заменять в пшеничной и никстамализованной кукурузной муке, а также уровень их добавления, за исключением муки, которая используется для: жарки, в качестве текстуризатора или загустителя и основы для готовой муки.

**1.4** Настоящий официальный мексиканский стандарт является обязательным на национальной территории для физических или юридических лиц, занимающихся производством или импортом продуктов, подпадающих под этот стандарт, предназначенных для потребителей на национальной территории.

**2. Ссылки**

Настоящий стандарт дополняется следующими официальными мексиканскими стандартами или теми, которые его заменяют:

• Поправка к официальному мексиканскому стандарту NOM-028-FITO-1995, устанавливающая фитосанитарные требования и характеристики для импорта зерна и семян, за исключением предназначенных для посева.

• NOM-086-SSA1-1994 - Товары и услуги. Пищевые продукты и безалкогольные напитки с изменениями в их составе. Пищевые требования

• NOM-120-SSA1-1994 - Товары и услуги. Гигиена и санитария при производстве пищевых продуктов, безалкогольных и алкогольных напитков.

• Поправка к официальному мексиканскому стандарту NOM-127-SSA1-1994 - Гигиена окружающей среды, вода для использования и потребления человеком. Допустимые пределы качества и обработки воды для питья.

**3. Определения**

В настоящем стандарте используются следующие определения:

**3.1 Добавить** - добавить одно или несколько питательных веществ, которые обычно содержатся в продукте или нет.

**3.2 Добавка** - любое вещество, которое как таковое обычно не потребляется в пищу или не используется в качестве основного ингредиента в пищевых продуктах, независимо от того, имеет ли оно питательную ценность или нет, и добавление которого в пищевой продукт в технологических целях (включая органолептические) на этапах производства, переработки, приготовления, обработки, упаковки, транспортировки или хранения приводит или может разумно предполагать (прямо или косвенно) непосредственно или при добавлении продуктов, произведенных из него, в компонент или элемент пищи, влияние на характеристики получаемого пищевого продукта. Это определение не включает “загрязняющие вещества” или вещества, добавляемые в пищевой продукт для поддержания или улучшения питательных качеств.

**3.3 Афлатоксины** - вторичные метаболиты, продуцируемые грибами *Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus и Aspergillus nomius*, которые оказывают токсическое и канцерогенное действие на животных, включая человека.

**3.4 Пищевой продукт** - любое вещество или продукт, твердое или полутвердое, натуральное или трансформированное, которое обеспечивает организм элементами для его питания.

**3.5 Пищевые продукты и безалкогольные напитки с изменениями в их составе** - продукты, в которые были внесены изменения путем добавления, уменьшения или удаления одного или нескольких питательных веществ, таких как углеводы, белки, жиры, витамины и минералы, и которые являются частью обычного рациона.

**3.6 Пищевые продукты, приготовленные из: зерновых, съедобных семян, муки, манной и прочей крупы или их смесей** - продукты питания, приготовленные из зерновых или других съедобных зерен и семян, цельных или их частей или измельченных (мука, манная и прочая крупа), произведенные с помощью физических процессов, пригодные для употребления непосредственно или после приготовления, с добавлением или без добавления добавок и других дополнительных ингредиентов. Эти продукты могут быть получены с помощью таких процессов, как вспучивание, прокатка, нанесение покрытия, обжарка, экструзия, агломерация или другие.

**3.7 Сахара** - все моносахариды и дисахариды, присутствующие в пищевом продукте или безалкогольном напитке.

**3.8 Биодоступность** - свойство питательного вещества, указывающее долю этого вещества, которое поглощается и используется организмом из пищи, количественно определяемое признанными экспериментальными методами.

**3.9 Зерновые** - съедобные зерна некоторых растений, принадлежащих к семейству односемядольных трав, такие как: пшеница, кукуруза, рис, овес, рожь, ячмень, сорго, амарант и другие.

**3.10 Технологический соадъювант** - вещество или материал, за исключением приборов, посуды и добавок, который сам по себе не потребляется в качестве пищевого ингредиента и преднамеренно используется при производстве сырья, пищевых продуктов или их ингредиентов для достижения некоторых технологических целей во время обработки или переработки, которые могут привести к непреднамеренному, но неизбежному присутствию остатков или производных в конечном продукте.

**3.11 Покрытие** - ингредиент, который добавляется к хлебобулочному изделию таким образом, чтобы покрыть его полностью или частично.

**3.12 Потребитель** - физическое или юридическое лицо, которое приобретает или пользуется расфасованными продуктами в качестве конечного получателя. Не является потребителем лицо, которое приобретает, хранит или использует расфасованные пищевые продукты и безалкогольные напитки для их интеграции в процесс производства, переработки, продажи или предоставления услуг третьим лицам.

**3.13 Доза** - содержание активного ингредиента каждого компонента в формуле премикса с питательными микроэлементами, независимо от веса химического состава, который его содержит и который был рекомендован.

**3.14 Внешняя упаковка** - материал, который обертывает, содержит и защищает расфасованные продукты для хранения и транспортировки.

**3.15 Внутренняя или первичная упаковка** - любая тара или упаковка, в которой содержится расфасованный продукт для продажи потребителю.

**3.16 Общая или множественная упаковка** - любая тара или упаковка, в которой содержатся две или более одинаковых или различных единиц расфасованных продуктов, предназначенных для продажи потребителю в таком виде.

**3.17 Этикетка** - любая этикетка, бирка, описание, изображение или другой описательный или графический материал, написанный, напечатанный, нанесенный по трафарету, маркированный, выгравированный с высоким или низким рельефом, наклеенный или наложенный на внутреннюю упаковку с расфасованным продуктом, или когда это невозможно по характеристикам продукта, на внешнюю упаковку.

**3.18 Срок годности** - крайний срок, когда расфасованный продукт считается хранящимся в условиях, предложенных производителем, по истечении которого ухудшаются санитарные характеристики, которым он должен соответствовать для потребления. До этой даты он должен быть продан или потреблен.

**3.19 Срок предпочтительного употребления** - дата, на которую при хранении в условиях, предложенных ответственным за продукт, истекает период, в течение которого расфасованный продукт является товарным и сохраняет определенные качества, приписываемые ему негласно или явно, - дата, до которой расфасованный продукт должен быть потреблен.

**3.20 Печенье** - продукт, состоящий в основном из смеси муки из пшеницы или других зерновых, жиров, пищевых масел или их смесей и воды, с начинкой или без, с добавлением или без сахара, других дополнительных ингредиентов и добавок для пищевых продуктов, подвергнутый замешиванию или взбиванию, а также другим процессам, таким как ферментация, формование, штамповка и последующая термообработка, в результате чего получается продукт с очень разнообразным внешним видом, характеризующийся низким содержанием воды.

**3.21 Цельное зерно** - крупа из неповрежденных зерен, которая, будучи подвергнута процессу измельчения, дробления, отслаивания и т. д. сохраняет свои основные анатомические компоненты и присутствует в относительно равной пропорции по сравнению с исходным неповрежденным зерном, что достигается естественным путем или посредством технологических средств.

**3.22 Мука или пшеничная мука** - мука, полученная в результате измельчения спелой, цельной, дробленой и сухой пшеницы из рода Triticum, L; вида *T. vulgare*, *T. compactum* y *T. durum* или их смеси, чистая, в которой большая часть отрубей и зародышей удаляется, а остальная часть измельчается до получения соответствующего помола.

**3.23 Рисовая мука** - продукт, полученный в результате измельчения рисового зерна, спелого, чистого, цельного или дробленого и сухого, вида *Oriza sativa*, L; белого или слегка желтоватого, которое может присутствовать с околоплодником или без него, без чешуек, и полированного.

**3.24 Овсяная мука** - продукт, полученный в результате измельчения овсяных зерен, спелых, чистых, цельных и сухих, вида *Avena sativa,* L; очищенных от оболочек.

**3.25 Ячменная мука** - продукт, полученный в результате измельчения ячменного зерна; спелого, чистого, цельного и сухого, вида *Hordeum vulgare*.

**3.26 Ржаная мука** - продукт, полученный в результате измельчения ржаного зерна, спелого, чистого, цельного и сухого, вида *Secale cereale*, без оболочек.

**3.27 Зерновая мука** - продукт, полученный из смеси двух или более злаков или видов муки из злаков.

**3.28 Цельнозерновая мука** - продукт, полученный в результате измельчения зерна, который содержит кожуру и другие его компоненты в соотношении, аналогичном соотношению исходного неповрежденного зерна, что достигается либо естественным путем, либо технологическими средствами.

**3.29 Кукурузная мука** - продукт, полученный в результате влажного или сухого измельчения зерен кукурузы; спелых, чистых и сухих, рода *Zea*, L; вида *Z*. *mays* и других.

**3.30 Никстамализованная кукурузная мука** - обезвоженный продукт, полученный в результате измельчения зерен никстамализованной кукурузы.

**3.31 Цельнозерновая мука** - продукт, полученный в результате измельчения зерна, который содержит его кожуру и другие составляющие.

**3.32 Информация о пищевой ценности или маркировка** - сообщение или подсчет содержания питательных веществ в расфасованных пищевых продуктах или безалкогольных напитках. Она включает в себя два аспекта:

**a)** Базовая информация о пищевой ценности.

**б)** Дополнительная информация о пищевой ценности.

**3.33 Дополнительные ингредиенты** - ингредиенты, которые могут быть добавлены в продукт, такие как натуральные сахара, мед, фрукты или другие съедобные продукты, их смеси или производные.

**3.34 Безвредный** - не наносит вреда здоровью.

**3.35 Максимальный предел** - установленное количество добавок, микроорганизмов, паразитов, примесей, пестицидов, радионуклидов, биотоксинов, остатков лекарств, тяжелых металлов и металлоидов, которое не должно превышаться в пищевом продукте, напитке или сырье.

**3.36 Партия** - количество продукта, произведенного в одном цикле, состоящее из однородных единиц.

**3.37 Никстамализованная кукуруза или никстамаль** - здоровая и чистая кукуруза, которая была подвергнута частичной варке в воде в присутствии гидроксида кальция (извести) или другого щелочного материала.

**3.38 Инородное вещество** - органический или неорганический материал, легкий или тяжелый, присутствие которого в продукте нежелательно и которое выше максимального предела считается загрязняющим веществом, включая экскременты, волоски любого вида, фрагменты насекомых, пластиковые материалы и другие предметы.

**3.39 Тяжелый металл или металлоид** - химические элементы, которые вызывают нежелательное воздействие на обмен веществ даже при низких концентрациях. Их токсичность зависит от доз, в которых они потребляются, а также от их накопления в организме.

**3.40 Методы тестирования** - аналитические процедуры, используемые в лаборатории, для проверки того, что продукт соответствует требованиям, установленным настоящим стандартом.

**3.41 Смесь витаминов и минералов или премиксы** - набор питательных веществ, которые должны быть добавлены на условиях и в количествах, указанных для каждого случая.

**3.42 Измельчение** - механизм, с помощью которого зерна злаков измельчаются и превращаются в частицы различных размеров, отделяемые друг от друга механическими средствами.

**3.43 Выборка** - общее количество единиц продукта, поступающих из партии и представляющих ее характеристики и условия.

**3.44 Питательное вещество** - любое вещество, включая белки, жиры или липиды, углеводы, воду, витамины и минералы, обычно потребляемые как компонент пищевого продукта или безалкогольного напитка, которое:

**a)** дает энергию; или

**б)** необходимо для роста, развития и поддержания жизни; или

**в)** отсутствие которого приводит к характерным химическим или физиологическим изменениям.

**3.45 Белый хлеб** - продукт, полученный в результате выпечки теста, полученного из ферментированной муки, воды и соли, кондиционеров и улучшителей теста, добавленных или не добавленных съедобных масел и жиров, молока, других ингредиентов и пищевых добавок.

**3.46 Хлеб из цельнозерновой муки** - продукт, полученный в результате выпечки закваски, приготовленной из смесей цельнозерновой пшеничной муки, муки из цельных злаков или бобовой муки, воды, соли, сахаров, съедобных жиров, других дополнительных ингредиентов и пищевых добавок**.**

**3.47 Сладкий хлеб** - продукт, который может быть приготовлен из муки, воды, яиц, сахаров, съедобных жиров или масел, дрожжей, который может включать или не включать пищевые добавки, фрукты в любом виде, соль и молоко; замешанный, ферментированный, формованный и запеченный или обжаренный в съедобных жирах или маслах.

**3.48 Макаронные изделия** - продукт, полученный путем механического замешивания манной купы, прочей крупы, муки или любой их комбинации с водой и другими разрешенными дополнительными ингредиентами, формованными, скрученными или экструдированными и подвергнутыми или не подвергнутым процессу термической сушки.

**3.49 Торты, пирожные или блины** - продукт, подвергаемый взбиванию и выпечке, приготовленный с использованием муки из злаков или бобовых, сахаров, жиров или масел, закваски и соли; с добавлением или без яиц и молока, взбитых сливок, фруктов и других дополнительных ингредиентов и пищевых добавок.

**3.50 Пирог** - продукт, сделанный из зерновой муки или молотого печенья, сахара, воды и соли, с закваской или без нее, пищевых жиров или масел, фруктов, кондитерских сливок, дополнительных ингредиентов и пищевых добавок; в форме, содержащей сладкую или соленую начинку, его можно запекать, жарить или замораживать.

**3.51 Пестициды** - любое вещество или смесь веществ, используемых для предотвращения, уничтожения, отражения или смягчения любых форм жизни, которые вредны для здоровья, собственности человека или окружающей среды, за исключением тех, которые существуют на людях или внутри них, а также простейшие вирусы, бактерии, грибы и другие подобные микроорганизмы на животных или в них.

**3.52 Гигиена** - меры, необходимые для обеспечения безопасности продуктов.

**3.53 Процесс** - комплекс мероприятий, связанных с получением, переработкой, изготовлением, приготовлением, сохранением, смешиванием, кондиционированием, упаковкой, перемещением, транспортировкой, распределением, хранением и продажей или поставкой продуктов потребителю.

**3.54 Сыпучий продукт** - продукт, который необходимо взвешивать, измерять или подсчитывать в присутствии потребителя, поскольку он не расфасован во время продажи.

**3.55 Кондитерские изделия** - изделия, которые готовятся путем выпечки ферментированного теста, приготовленного из муки пшеницы или других злаков, воды, соли, сахаров, съедобных жиров, закваски, пищевых добавок и дополнительных ингредиентов.

**3.56 Хлебобулочные изделия** - изделия, полученные из смесей зерновой муки или муки из цельных злаков или бобовых и питьевой воды, ферментированных или нет, которые могут содержать: масло, маргарин, съедобные масла, растительные жиры, соль, закваску, разрыхлитель и другие пищевые добавки, специи и другие дополнительные ингредиенты, такие как сахара, мед, фрукты, соки, съедобные зерна и семена и т.д.; подвергаются выпечке, приготовлению или жарке; с начинкой или без начинки или с покрытием; могут храниться при комнатной температуре, охлаждаться или замораживаться в зависимости от случая.

**3.57 Расфасованный продукт** - пищевые продукты и безалкогольные напитки, которые помещены в упаковку любого типа в отсутствие потребителя, и количество продукта, содержащегося в упаковке, не может быть изменено, если она не будет открыта или существенно изменена.

**3.58 Восстановление** означает добавление к пищевому продукту питательного вещества или питательных веществ, которые были потеряны в ходе производства или во время хранения и перемещения, в таких количествах, которые приводят к содержанию в пищевом продукте необходимых концентраций питательного вещества или питательных веществ в съедобной части пищевого продукта перед переработкой, хранением или перемещением.

**3.59 Охлаждение** - физический способ консервации, с помощью которого продукт поддерживается при максимальной температуре 7°C (280 K).

**3.60 Начинка** - ингредиент, добавленный до или после выпечки и находящийся внутри или между двумя или более единиц хлебобулочных изделий.

**3.61 Манная и прочая крупа** - гранулометрические фракции, отличные от фракций муки, полученные в результате измельчения зерновых, без покровов и зародышей.

**3.62 Съедобные семена** - семена, которые потребляются непосредственно или используются при производстве других продуктов, такие как: бобовые, семена тыквы и подсолнечника и другие.

**4. Условные обозначения и сокращения**

В этом стандарте используются следующие условные обозначения и сокращения:

|  |  |
| --- | --- |
| AF | афлатоксины |
| Alc.Vol. | объем спирта |
| As | мышьяк |
| BPF | надлежащая производственная практика |
| CE | коэффициент ослабления |
| Cd | кадмий |
| см | сантиметр |
| cSt | сантисток |
| C.I. | индекс цвета |
| и | константа соразмерности |
| °C | градус Цельсия |
| IDR | Рекомендуемое ежедневное потребление |
| K | градус Кельвина |
| г | грам |
| ч | час |
| = | равно |
| Ккал | килокалория |
| кг | килограмм |
| кДж | килоджоуль |
| L | вращающийся против часовой стрелки |
| LMR | остаточный максимальный предел |
| ± | плюс-минус |
| > | больше, чем |
| < | меньше, чем |
| ≤ | меньше или равно |
| HPLC (ВЭЖХ) | жидкостная хроматография высокого разрешения |
| мкг | микрограмм |
| м | метр |
| мг | миллиграмм |
| мл | миллилитр |
| мкл | микролитр |
| мкм | микрометр |
| мм | миллиметр |
| м/м | масса масса |
| ММ | миллимолярный |
| мин | минута |
| М | молярный |
| N | нормальный |
| нг | нанограмм |
| нм | нанометр |
| NMP | наиболее вероятное число |
| Нет | число |
| Ø | диаметр |
| p | вес |
| Pb | свинец |
| PBS | буферный раствор фосфатов |
| pH | водородный потенциал |
| в/в | вес вес |
| в/о | вес объем |
| spp | любой вид |
| тонн | тонны |
| тонн/мин | тонны в минуту |
| о/о | объем объем |
| X | разрешающая способность |
| / | на |
| x | на |
| % | процент |
| КОЕ | колониеобразующие единицы |
| v | объем |

В этом стандарте упоминается:

**Соглашение** - следует понимать, что это соглашение, определяющее вещества, разрешенные в качестве добавок и соадъювантов в пищевых продуктах, напитках и пищевых добавках, и их модификации.

**CICOPLAFEST** - следует понимать, что это Межведомственная комиссия по контролю за производством и использованием пестицидов, удобрений и токсичных веществ.

**Закон** - следует понимать, что это Общий Закон о здравоохранении.

**Регламент** - следует понимать, что речь идет о регламенте санитарного контроля за продуктами и услугами.

**Министерство** - следует понимать, что речь идет о Министерстве здравоохранения.

**5. Санитарные требования**

**5.1** Общие положения

Сырье, используемое для производства продуктов, подпадающих под действие настоящего стандарта, должно соответствовать тому, что установлено Регламентом и соответствующими Официальными мексиканскими стандартами.

**5.1.1** В процессе производства продуктов, подпадающих под действие настоящего стандарта, должны применяться гигиенические и санитарные правила, изложенные в стандарте NOM-120-SSA1-1994, приведенном в разделе ссылок.

**5.1.2** Вода, используемая в производстве, должна соответствовать допустимому пределу свободного остаточного хлора и общего количества кишечных и фекальных организмов, установленному в стандарте NOM-127-SSA-1-1994, приведенном в разделе ссылок.

**5.1.3** Продукты, подпадающие под настоящий стандарт с изменениями в их составе, должны подчиняться Регламенту и стандарту NOM-086-SSAI-1994, приведенным в разделе ссылок.

**5.1.4** Поставщик сырья, транспортные подразделения и предприятия, на которых производятся или реализуются продукты, подпадающие под действие настоящего стандарта, каждый в рамках своей ответственности, могут использовать только пестициды, санкционированные Министерством, в пределах, утвержденных CICOPLAFEST.

**5.2** Частные положения

**5.2.1** Транспортировка и хранение зерновых, предназначенных для потребления человеком.

**5.2.1.1** Транспортные подразделения должны подвергаться очистке, включая удаление грязи, растительных остатков, почвы, экскрементов, остатков животных, вредной фауны, паутины, химических веществ, их упаковки или любых продуктов или веществ, вредных для продукта.

**5.2.1.2** Импортные зерновые должны подчиняться тому, что указано в стандарте NOM-028-FITO-1995, приведенном в разделе ссылок.

**5.2.1.3** Крытые и открытые хранилища должны уведомлять о своей работе, как указано в статье 200-бис Закона, посредством процедуры SSA-04-001-A Уведомление о работе, в дополнение к соблюдению следующих требований:

**i)** Установить в письменной форме, если имеются, места хранения зерновых, превышающие максимальный предел AF, указанный в этом стандарте.

**ii)** В случае хранения на открытом воздухе должны быть установлены устройства, предотвращающие контакт зерновых с почвой, и термопары. Контейнеры не должны иметь утечек или поломок.

**iii)** Хранилища должны представлять собой здания со стенами, полами и дверями, крышей, в которых не должно быть утечек, гнезд, трещин или ветхих дверей. Они также должны иметь термопары, размещенные в разных точках хранилища для контроля температуры.

**iv)** При хранении:

**iv. 1)** Не следует хранить в одном хранилище зерновые с концентрацией более 20 мкг/кг AF.

**iv. 2)** Во время приема зерно должно быть высушено в кратчайшие сроки до достижения влажности менее или равной 14,5%, которая должна поддерживаться или уменьшаться в течение всего времени хранения.

**iv. 3)** К злакам допускается применять фунгистат при условии, что он используется в соответствии с инструкциями производителя, указанными на этикетке.

**iv. 4)** Зерновые не могут находиться в непосредственном контакте с полом.

**v)** Загрязняющие вещества.

|  |  |
| --- | --- |
| **Определение** | **Максимальный предел** |
| Афлатоксины | 20 мкг/кг |

**vi)** Для целей контроля хранилище должно быть задокументировано в журналах или реестрах таким образом, чтобы гарантировать выполнение требований, установленных в Таблице 1. Реестры или журналы, включая журналы, подготовленные с помощью электронных средств, должны:

**vi. 1)** Иметь резервные копии для обеспечения достоверности информации и процедуры предотвращения неконтролируемого доступа и исправлений.

**vi. 2)** Храниться по крайней мере в течение одного года и предоставляться ведомству здравоохранения, когда это необходимо.

**vi. 3)** За разработку формата отвечает отдельное лицо.

**Таблица 1. Минимальная информация из журналов или реестров**

|  |  |
| --- | --- |
| **Регистрируется:** | **Информация** |
| Хранение | **a)** | Места, где будут храниться зерновые, превышающие максимальный предел. |
| **б)** | Происхождение продуктов. |
| **в)** | Даты приема и перемещения продукции. |
| **г)** | Расположение точек нагрева (если таковые имеются). |
| Анализ продукта | **a)** | Физические данные зерна: |
| - | Процент влажности. |
| - | Процент поврежденного зерна. |
| - | Процент вредителей. |
| - | Температура. |
| - | Результаты. |
| - | Даты. |
| **б)** | Афлатоксины: |
| - | Результаты. |
| - | Зоны выборки. |
| - | Даты. |
| - | Используемый(-е) метод(-ы). |

**5.2.2**  Зерновая мука, манная и прочая крупа.

Зерновые, используемые в качестве сырья при производстве продуктов, охватываемых настоящим подпунктом, должны соответствовать следующему положению:

**5.2.2.1** Производитель зерна, его продавец или промышленник, каждый в рамках своей ответственности, должен следить за тем, чтобы пестициды, используемые для обработки хранимого зерна и семян, в транспортных средствах, хранилищах, пустых помещениях и для борьбы с грызунами, а также для дезинфекции и защиты зерна, хранящегося навалом или в мешках, соответствовали ограничениям использования и не превышали максимальные остаточные уровни, установленные в Каталоге пестицидов CICOPLAFEST.

**5.2.2.2** Продукты, подпадающие под этот раздел, в дополнение к соблюдению Регламента, должны соответствовать следующим требованиям:

**5.2.2.3** Физические

|  |  |
| --- | --- |
| **Определение** | **Максимальный предел** |
| Влажность | 15% |
| Примеси | Не более 50 фрагментов насекомых, не более одного волоса грызунов и без экскрементов в 50 г продукта. |

**5.2.2.4** Микробиологические

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Аэробные мезофильные КОЕ/г** | **Общая кишечная палочка КОЕ/г** | **Грибы КОЕ/г** |
| Пшеничная мука, манная и прочая крупа | 50,000 | NA | 300 |
| Кукурузная мука | 100,000 | 100 | 1000 |
| Никстамализованная кукурузная мука | 50,000 | 100 | 1000 |
| Ржаная мука | 100,000 | 100 | 200 |
| Ячменная мука | 100,000 | 100 | 200 |
| Овсяная мука | 50,000 | 50 | 100 |
| Рисовая мука | 100,000 | 100 | 200 |
| Цельнозерновая мука | 500,000 | 500 | 500 |
| Пшеничная цельнозерновая мука | 500,000 | NA | NA |

NA = не применяется

**5.2.2.5** Загрязняющие вещества

|  |  |
| --- | --- |
| **Определение** | **Максимальный предел****мкг/кг** |
| Афлатоксины | 20 |
| Афлатоксины для никстамализованной кукурузной муки | 12 |

**5.2.2.6** Продукты, охватываемые настоящим подпунктом, должны периодически подвергаться анализу для определения Pb и Cd для целей мониторинга. Исходные (справочные) уровни задаются в таблице ниже.

|  |  |
| --- | --- |
| **Тяжелые Металлы** | **Максимальный предел****мг/кг** |
| Свинец (Pb) | 0,5 |
| Кадмий (Cd) | 0,1 |

**5.2.2.7** Пищевые требования

**i)** Пшеничная и никстамализованная кукурузная мука должна быть восстановлена следующими питательными веществами и до следующих уровней.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Питательное вещество** | **Минимальный уровень добавления мг/кг муки** | **Рекомендуемый источник** |
| Тиамин (витамин B1) | 5 | Мононитрат тиамина |
| Рибофлавин (витамин В2) | 3 | Рибофлавин |
| Ниацин (витамин B3) | 35 | Никотинамид |

**ii)** Пшеничная и никстамализованная кукурузная мука должна быть восстановлена следующими питательными веществами и до следующих уровней, указанных ниже.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Питательное вещество** | **Минимальный уровень добавления мг/кг муки** | **Рекомендуемый источник** |
| Фолиевая кислота | 2 | Фолиевая кислота |
| Железо (как ион двухвалентного железа) | 40 | Сульфат или фумарат двухвалентного железа |
| Цинк | 40 | Оксид цинка |

**ii.1)** При использовании сульфата двухвалентного железа в качестве источника железа, доля иона двухвалентного железа должна составлять 31,61%; при использовании фумарата двухвалентного железа, его доля должна составлять 31,4%

**ii.2)** При использовании оксида цинка в качестве источника цинка, его доля должна составлять 79,54%.

**ii.3)** Могут использоваться другие источники железа и цинка при условии, что биодоступное количество, по крайней мере, эквивалентно количеству рекомендованных источников.

**iii)** Следующие продукты освобождаются от восстановления и добавления микроэлементов:

**iii.1)** Мука для промышленного использования, отличного от потребления человеком.

**iii.2)** Манная и прочая крупа для макаронных изделий, для которой восстановление и добавление может производиться при производстве макаронных изделий с соответствующими уровнями добавления, за исключением цинка.

**iv)** Для целей контроля предприятия, занимающиеся производством пшеничной муки и никстамализованной кукурузной муки, должны иметь следующую информацию о восстановлении и добавлении питательных веществ:

**iv.1)** Письменные процедуры для процесса восстановления и добавления, а также меры контроля, применяемые для гарантии их эффективности, включая корректирующие меры, которые будут применяться в случае отклонений.

**iv.2)** Учет критических переменных процесса, свидетельствующих о соблюдении процедур восстановления и добавления, включая отчеты о корректирующих действиях, применяемых при обнаружении отклонений или несоблюдения пищевых требований, и результаты анализа готового продукта (самоконтроль).

**v)** Премиксы с питательными веществами должны соответствовать следующим требованиям:

**v.1)** Доза должна быть достаточной для достижения минимального уровня каждого питательного вещества при восстановлении и добавлении в мг/кг муки.

**v.2)** Упаковка должна обеспечивать стабильность и целостность питательных веществ, необходима защита от света, материалы должны быть пищевыми.

**v.3)** Для стабильности и хранения необходимо следовать указаниям производителя в спецификации, листе безопасности и/или сертификате анализа.

**vi)** Должны быть представлены документальные доказательства того, что мука, которая не была восстановлена и в которую не производились добавки, будет использоваться для: жарки, в качестве текстуризатора или загустителя или в качестве основы для готовой муки.

**5.2.2.8** Пищевые добавки.

Допускается использование только тех добавок, которые указаны в Приложении А к Стандарту.

**5.2.3** Продукты питания на основе: зерновых, съедобных семян, муки, манной и прочей крупы или их смесей.

Продукты, указанные в этом разделе, должны соответствовать следующим требованиям:

**5.2.3.1** Микробиологические

|  |  |
| --- | --- |
| **Требования** | **Максимальный предел** |
| Аэробные мезофильные | 10 000 КОЕ/г |
| Грибы | 300 КОЕ/г |
| Общая кишечная палочка | <30 КОЕ/г |
| \**Сальмонелла* spp в 25 г | отрицательный ответ |

\* Только для яичных макаронных изделий

**5.2.3.2** Они должны периодически проходить анализ для определения Pb и Cd для целей мониторинга. Исходные уровни указаны в таблице в пункте 5.2.2.6.

**5.2.3.3** Примеси.

Не более 50 фрагментов насекомых, не более одного волоса грызунов и без экскрементов в 50 г продукта.

**5.2.3.4** Пищевые добавки.

Допускается использование только тех добавок, которые указаны в Приложении А к Стандарту.

**5.2.4**Хлебобулочные изделия.

**5.2.4.1** Для того, чтобы установить санитарные нормы по своим характеристикам, продукты, охватываемые этим разделом, подразделяются на:

Печенье.

Печенье с начинкой или покрытием или их сочетанием.

Белый хлеб.

Сладкий хлеб.

Хлеб из цельнозерновой муки.

Торты, пирожные и блины.

Пироги.

Кондитерские изделия.

**5.2.4.2** Продукты, подпадающие под этот раздел, в дополнение к соблюдению Регламента, должны соответствовать следующим требованиям:

**i)** При использовании этилового спирта в качестве ингредиента он не должен превышать 1,99% в/в

**ii)** Микробиологические.

**ii.1)** Для белого хлеба, хлеба из цельнозерновой муки и кондитерских изделий:

|  |  |
| --- | --- |
| **Требования** | **Максимальный предел** |
| Аэробные мезофильные | 1000 КОЕ/г |
| Общая кишечная палочка | <10 КОЕ/г |

**ii.2)** Сладкий хлеб:

|  |  |
| --- | --- |
| **Требования** | **Максимальный предел** |
| Аэробные мезофильные | 5000 КОЕ/г |
| Общая кишечная палочка | 20 КОЕ/г |
| *Золотистый стафилококк* \* | < 100 КОЕ/г |

\* Должен определяться только в продукте, содержащем начинку или покрытие на основе яиц, молока, заварного крема или другого готового пищевого продукта.

**ii.3)** Печенье:

|  |  |
| --- | --- |
| **Требования** | **Максимальный предел** |
| Аэробные мезофильные | 3000 КОЕ/г |
| Общая кишечная палочка | <10 КОЕ/г |

**ii.4)** Печенье с начинкой или покрытием или их сочетанием.

|  |  |
| --- | --- |
| **Требования** | **Максимальный предел** |
| Аэробные мезофильные | 5000 КОЕ/г |
| Общая кишечная палочка | 20 КОЕ/г |

**ii.5)** Торты, пирожные, блины и пироги:

|  |  |
| --- | --- |
| **Требования** | **Максимальный предел** |
| Аэробные мезофильные | 10000 КОЕ/г |
| Общая кишечная палочка | 20 КОЕ/г |
| *Сальмонелла spp* в 25 г | Отрицательный ответ |
| *Кишечная палочка*\* | Отрицательный ответ |
| *Золотистый стафилококк* \*\* | 100 КОЕ/г |

\* Будет определяться только в чрезвычайных санитарных ситуациях, когда Министерство в соответствии с выборкой и результатами микробиологического анализа обнаружит наличие такого микроорганизма.

\* Данное требование должно применяться только к тортам, пирожным и пирогам, содержащим начинку или покрытие на основе яиц, молока, заварного крема или другого готового пищевого продукта.

**5.2.4.3** Примеси.

Не более 50 фрагментов насекомых, не более одного волоса грызунов и без экскрементов в 50 г продукта.

**5.2.4.4** Продукты, охватываемые настоящим подпунктом, должны периодически подвергаться анализу для определения Pb и Cd для целей мониторинга. Исходные (справочные) уровни указаны в таблице в пункте 5.2.2.6.

**5.2.4.5** Пищевые добавки.

Допускается использование только тех добавок, которые указаны в Приложении А к Стандарту.

**6. Отбор проб**

Процедура отбора проб для продуктов, подпадающих под действие этого стандарта, должна соответствовать положениям Общего закона о здравоохранении.

**6.1** Метод отбора проб зерновых на афлатоксины должен осуществляться в соответствии с Приложением В к Стандарту.

**7. Методы тестирования**

**7.1** Для проверки характеристик продуктов, подпадающих под действие настоящего стандарта, должны применяться методы тестирования, указанные в Приложении C к Стандарту.

**8. Маркировка**

Печатные этикетки или упаковка расфасованных продуктов, подпадающих под этот стандарт, в дополнение к соблюдению Регламента, должны соответствовать следующему:

**8.1** Общие Требования

**8.1.1** Продукты, подпадающие под этот стандарт с изменениями в их составе, должны подчиняться Регламенту и стандарту NOM-086-SSAI-1994, приведенным в разделе ссылок.

**8.1.2** Продукты, предназначенные для продажи на внутреннем рынке, должны иметь маркировку с информацией, указанной в настоящем стандарте, на испанском языке, независимо от того, может ли она быть и на других языках, при этом следует обеспечить, чтобы шрифты были по крайней мере одинаковыми по размеру и одинаково четкими.

**8.1.3** Информация на этикетках должна быть представлена ​​и описана четко, правдиво и достоверно.

**8.1.4** Этикетки расфасованных продуктов должны закрепляться таким образом, чтобы они оставались целыми на момент использования и потребления продуктов в нормальных условиях, и наноситься на каждую единицу, общую или коллективную упаковку четким, видимым, нестираемым шрифтом с контрастными цветами, который легко читается потребителем в обычных обстоятельствах покупки и использования.

**8.1.5** На основной поверхности упаковки продукта должно отображаться, по крайней мере, название расфасованного продукта. Остальная информация, указанная в настоящем Официальном мексиканском стандарте, может быть включена в любую другую часть упаковки продукта.

**8.1.6** В случае общей или коллективной упаковки для продажи потребителю информация, указанная в настоящем Официальном мексиканском стандарте, должна быть указана на этой упаковке. Однако указание партии и даты истечения срока годности или предпочтительного употребления должны отображаться на каждой единице и не должны указываться на общей или коллективной упаковке. Кроме того, на продуктах должна быть указана надпись "No etiquetado para su venta individual" (Не маркировано для индивидуальной продажи), если продукты не декларируют информацию, указанную в настоящем стандарте. Эта надпись не требуется, если индивидуальные упаковки, содержащиеся в общей или коллективной упаковке, имеют информацию, указанную в настоящем Официальном мексиканском стандарте.

**8.1.7** Если общая или коллективная упаковка покрыта оболочкой, на ней должна содержаться вся необходимая информация, за исключением случаев, когда нанесенная этикетка может легко прочитываться через внешнюю оболочку.

**8.1.8** Если на этикетках заявлено в письменной, графической или описательной форме, что продукты, их использование, применение, ингредиенты или любые другие характеристики рекомендуются, одобрены или приняты исследовательскими центрами, ассоциациями, организациями и прочими. Соответствующее техническая поддержка должна быть доступна Министерству по его просьбе. Такие заявления должны соответствовать следующему: надпись должна четко описывать указанную характеристику, предшествовать условному обозначению или названию ведомства и содержать четкие и легко читаемые символы.

**8.2** Название или наименование расфасованного продукта

**8.2.1** Название или наименование расфасованного продукта должно соответствовать названию или наименованию, установленному в конкретных правовых нормах, в отсутствие которых может быть указано обычно используемое название или может использоваться описание в соответствии с основными характеристиками состава и характера продукта, которое не вводит потребителя в заблуждение. В случае, если продукт подвергся какой-либо обработке, можно по желанию указать название такой обработки, если указание названия такой обработки согласно соответствующим нормам не является обязательным.

**8.3** Указание ингредиентов.

**8.3.1** На этикетке расфасованных продуктов, реализуемых в индивидуальном порядке, должен быть указан список ингредиентов, который может не указываться в случае продуктов с одним ингредиентом.

**8.3.2** Список ингредиентов должен начинаться или предваряться термином "ingredientes:" (ингредиенты:)

**8.3.3** Ингредиенты должны быть перечислены в количественном порядке убывания (м/м).

**8.3.4** Составной ингредиент должен быть указан, когда он составляет более 25 процентов продукта, и должен сопровождаться списком в скобках составляющих его ингредиентов в количественном порядке убывания (м/м). В тех случаях, когда он меньше этого процента, добавки, играющие технологическую роль в производстве продукта, и ингредиенты или добавки, связанные с аллергическими реакциями, должны быть указаны в соответствии с соответствующими правовыми нормами.

**8.3.5** Когда речь идет об обезвоженных или конденсированных продуктах, предназначенных для восстановления, их ингредиенты могут быть перечислены в количественном порядке убывания (м/м) в восстановленном продукте при условии, что на этикетке содержится следующее указание: "ingredientes del producto cuando se prepara según las instrucciones de la etiqueta" (ингредиенты продукта при приготовлении в соответствии с инструкциями на этикетке) или подобное.

**8.3.6** В списке ингредиентов должно использоваться конкретное наименование, за исключением классов ингредиентов, указанных в Приложении I, где может использоваться общее наименование.

**8.3.7** Несмотря на то, что указано в предыдущем пункте, сало и жир всегда должны быть указаны их конкретным наименованием.

**8.3.8** Добавки, используемые при производстве продуктов, подпадающих под действие этого стандарта, должны сообщаться под общим названием или синонимами, изложенными в Соглашении с последующими поправками, за исключением ароматизаторов и ферментов, которые могут быть указаны под общим названием.

**8.3.9** Любая добавка, которая была использована в ингредиентах и перешла в другой продукт в значительном или достаточном количестве для выполнения технологической функции, должна быть включена в список ингредиентов.

**8.3.10** Из перечня ингредиентов исключаются добавки, перешедшие в
расфасованные продукты, которые больше не выполняют технологическую функцию в готовом продукте, а также
 соадъюванты для переработки, за исключением тех, которые могут вызывать аллергические реакции и непереносимость.

**8.4.** Название и налоговый адрес.

**8.4.1** Наименование или название компании и налоговый адрес ответственного за продукт должны быть указаны, последний должен включать в себя, но не ограничиваясь: улицу, номер дома, почтовый индекс, город и штат.

**8.4.2** Для расфасованных импортных товаров на этикетке должны быть указаны наименование или название компании и налоговый адрес импортера. Эта информация может быть включена в продукт, расфасованный на национальной территории, до реализации продукта.

Если на предприятии, отличном от физического или юридического лица, лицензиат или владелец товарного знака участвуют в процессе производства продуктов, на этикетке должна быть указана надпись “HECHO PARA...” (СДЕЛАНО ДЛЯ...) или подобная, за которой следует название или адрес (улица, номер дома, район, почтовый индекс, город и штат) ответственного за продукт, а также партия должна позволять идентифицировать предприятие или предприятия, участвующие в процессе производства.

**8.5** Страна происхождения

Необходимо включить надпись, указывающую страну происхождения продукта, например: “Hecho en….”, “Producto de …”, “Fabricado en ….”, (“Сделано в....“, ”Произведено в...“, ”Изготовлено в....“) или аналогичную надпись, за которой следует страна происхождения.

**8.6** Идентификация ключа партии.

**8.6.1** Каждая упаковка должна иметь выгравированный или маркированный каким-либо образом идентификатор партии, к которой она
 относится, с указанием, которое может быть ключом, позволяющим ее отслеживать.

**8.6.2** Идентификатор партии, включенный производителем в расфасованный продукт, не должен быть каким-либо образом изменен или скрыт.

**8.6.3** При указании формата даты добавьте слово “Lote” (Партия) или его аббревиатуру “L”.

**8.6.4** Если идентификатор партии соответствует дате истечения срока годности, добавьте надпись “Lote” и “Fecha de caducidad” (“Партия” и “Срок годности”) или их сокращения “L y Fech. Cad.” или “L y Cad.”

**8.7** Срок годности или предпочтительного употребления

**8.7.1** Продукты, на которые распространяется настоящий стандарт, должны указывать срок годности или предпочтительного употребления и соответствовать следующему:

**i)** Производитель должен указать его на упаковке или этикетке, которая должна состоять как минимум из:

- День и месяц для продуктов с максимальным сроком годности три месяца;

- Месяц и год для продуктов со сроком годности более трех месяцев.

**ii)** Дате должна предшествовать надпись, указывающая, что эта дата относится к сроку

годности или предпочтительного употребления.

- В случае срока годности он должен быть указан путем размещения любой из следующих надписей, их сокращений или аналогичных надписей:

“Fecha de caducidad \_\_\_”, “Caducidad \_\_\_\_”, “Fech Cad \_\_\_\_” (Срок годности),

- Предпочтительное употребление должно быть указано путем размещения любой из следующих надписей, их сокращений или аналогичных надписей:

“Consumir preferentemente antes del\_\_\_\_”, “Cons. Pref. antes del \_\_\_”. (Предпочтительно употребить до\_\_\_)

**8.7.2** Срок годности или предпочтительного употребления должен указывать на этикетке любые особые условия, необходимые для хранения расфасованного пищевого продукта или безалкогольного напитка, если от их соблюдения зависит действительность срока. Например, вы можете включить такие надписи, как: "manténgase en refrigeración" (хранить в холодильнике); "consérvese en congelación" (хранить в морозильной камере); "una vez descongelado no deberá volverse a congelar"(размороженный продукт нельзя повторно замораживать); "una vez abierto, consérvese en refrigeración" (после открытия хранить в холодильнике) или тому подобное.

**8.7.3** Срок годности или предпочтительного употребления, указанный производителем на расфасованном продукте, не может быть изменен ни в коем случае и ни при каких обстоятельствах.

**8.8** Надписи по хранению

**8.8.1** На зерновой муке и продуктах, изготовленных из зерновых, съедобных семян, муки или их смесей, и хлебобулочных изделиях, должна содержаться надпись "Consérvese en lugar seco y fresco" (Хранить в сухом и прохладном месте) или подобная.

**8.8.2** Для продуктов, подпадающих под действие настоящего стандарта, требующих охлаждения или замораживания, должны быть включены соответствующие надписи: "Manténgase o consérvese en refrigeración o congelación" (Хранить в холодильнике или морозильной камере) или подобная надпись.

**8.9** Инструкция по применению

**8.9.1** Этикетка должна содержать инструкции по применению, когда это необходимо, включая восстановление, когда это необходимо, для обеспечения правильного использования расфасованного продукта.

**8.10** Маркировка пищевой ценности

**8.10.1** Указание пищевой ценности на этикетке продуктов, подпадающих под действие настоящего стандарта, является обязательным и должно включать как минимум следующее:

**a)** Энергетическая ценность

**б)** Количество белков,

**в)** Количество углеводов с указанием количества, соответствующего сахарам

**г)** Количество жиров или липидов с указанием количества, соответствующего насыщенным жирам. Хлебобулочные изделия должны дополнительно указывать содержание транс-жирных кислот.

**д)** Количество клетчатки

**е)** Количество натрия

**ж)** Количество питательных веществ с указанием их свойств.

**з)** Количество любых других питательных веществ, которые считаются важными для поддержания хорошего питания, как это установлено соответствующим стандартом.

**8.10.2** Когда делается конкретное заявление о свойствах, касающееся количества или типа углеводов, может также указываться количество крахмала и/или других компонентов углеводов.

**8.10.3** Когда делается заявление о свойствах в отношении количества или типа жирных кислот или количества холестерина, следует указать количество: мононенасыщенных жирных кислот, полиненасыщенных жирных кислот и холестерина

**8.11.** Представление информации о пищевой ценности

**8.11.1** Заявление о содержании питательных веществ должно быть сделано в числовой форме.

**8.11.2** Заявление в числовой форме должно быть выражено на 100 г или на 100 мл или на порцию или на упаковку, если она содержит только одну порцию или указано количество порций, содержащихся в упаковке. Что должно быть указано в следующих единицах:

**i.** Энергетическая ценность в килоджоулах( кДж) или в килокалориях (ккал).

**ii.** Белки в граммах (г)

**iii.** В граммах углеводы (г), сахар (г)

**iv.** в граммах жиры или липиды (г), насыщенные жирные кислоты (г), транс-жирные кислоты (г)

**v.** Клетчатка (г)

**vi.** Натрий в граммах (г) или миллиграммах (мг)

Кроме того, могут использоваться другие единицы измерения.

**8.11.3** Численное заявление о белках, витаминах и минералах должно выражаться в единицах измерения или в процентах от рекомендуемого ежедневного потребления (IDR) на 100 г или на 100 мл или на порцию или на упаковку, если она содержит только одну порцию. В случае заявления в процентах от IDR следует привести следующую надпись “IDR ponderada para la población mexicana” (Взвешенное IDR для мексиканского населения) или “Ingestión diaria recomendada ponderada para la población mexicana” (Взвешенное рекомендуемое ежедневное потребление для мексиканского населения).

В этих случаях следует использовать таблицу взвешенных рекомендаций для мексиканского населения, содержащуюся в Приложении II к настоящему стандарту.

**8.11.4** Информация о пищевой ценности может быть представлена в соответствии с примером в таблице ниже. Не обязательно заявлять ее в такой форме.

**Представление информации о пищевой ценности**

|  |
| --- |
| **Представление информации на 100 г, на 100 мл, на порцию или на упаковку** |
| Энергетическая ценность |  кДж (ккал) |
| Белки |  г |
| Жиры |  г, из которых г насыщенных жиров. |
| Углеводы |  г, из которых г сахара |
| Клетчатка |  г |
| Натрий |  г или мг |
| Дополнительная информация |  г, мг, мкг или % IDR |

**8.11.5** Значения броматологического состава, содержащиеся в информации о пищевой ценности продукта, должны быть средневзвешенными значениями, полученными с помощью международно признанных анализов, баз данных или таблиц.

**8.11.6** Значения питательных веществ, указанные в информации, могут иметь определенную степень варьирования, которая при этом должна гарантировать потребителю, что значения, заявленные на этикетке, соответствуют значениям, содержащимся в продукте до истечения срока годности.

**8.12** Расчет питательных веществ

**8.12.1** Энергетическая ценность должна быть рассчитана с использованием следующих коэффициентов пересчета:

Углеводы 4 ккал/г 17 кДж

Белки 4 ккал/г 17 кДж

Жиры 9 ккал/г 37 кДж

Спирт 7 ккал/г 29 кДж

Органические кислоты 3 ккал/г 13 кДж

**8.12.2** Белки, количество заявленных белков должно быть рассчитано по следующей формуле:
 Белок = общее содержание азота Кьельдаль x 6.25

**8.12.3** В тех случаях, когда для расчета энергетической ценности необходимо учитывать содержание полиолов или полидекстрозов, следует использовать следующие коэффициенты пересчета:

Полиолы 2,4 ккал/г 10 кДж

Полидекстрозы 1 ккал/г 4 кДж

**8.13.** Дополнительная информация о пищевой ценности

**8.13.1** Использование дополнительной информации о пищевой ценности, письменной или графической, на этикетках продуктов является необязательным и ни в коем случае не должно заменять информацию о пищевой ценности.

**8.13.2** При представлении дополнительной информации о пищевой ценности должны применяться следующие критерии:

**8.13.3** Включение одного из следующих питательных веществ не требует включения одного из других и производится только в том случае, если указан IDR и содержание данного питательного вещества выше 5% от IDR:

Витамин А (% IDR), Витамин Е (% IDR), Витамин C (% IDR), Витамин В1 (Тиамин) (% IDR), Витамин B2 (Рибофлавин) (% IDR), Витамин B6 (Пиридоксин) (% IDR), Витамин В12 (Цианокобаламин) (% IDR), Кислота фолиевая (Фолацин) (% IDR), Ниацин (никотиновая кислота,) (% IDR), Кальций (% IDR), Фосфор (% IDR), Магний (% IDR), Железо (% IDR), Цинк (% IDR), Йод (% IDR).

**8.13.4** Все или ни одно из следующих:

Полиненасыщенный жир \_ \_ \_ г; мононенасыщенный жир \_\_ г; транс-жирные кислоты \_ \_ \_ г; холестерин \_ \_ \_ мг.

**8.13.5** Включение одного из следующих не требует включения других:
крахмалы \_ \_ \_ г; клетчатка \_\_ г; полиолы \_ \_ г; полидекстрозы \_\_ г.

**8.13.6** При выражении типов составляющих углеводов и липидов или жиров, упомянутых в подпунктах в) и г) пункта 8.10.1, следует добавить текст "del cual..." (из которых...)

**8.13.7** Количество порций на заявление.

**8.13.8** Дополнительная информация о пищевой ценности может быть представлена в соответствии со следующим

**Представление дополнительного завления пищевой ценности**

|  |  |
| --- | --- |
| **Питательные вещества** | **Процент IDR** |
| Витамин А | % |
| Витамин B1 (Тиамин) | % |
| Витамин В2 (Рибофлавин) | % |
| Витамин B6 (Пиридоксин) | % |
| Витамин B12 (Кобаламин) | % |
| Витамин С (Аскорбиновая кислота) | % |
| Ниацин (никотиновая кислота) | % |
| Фолиевая кислота (Фолацин) | % |
| Железо | % |
| Калий | % |

**8.13.9** Дополнительная информация о пищевой ценности на этикетках должна сопровождаться образовательными программами для потребителей, чтобы повысить их способность понимать и использовать информацию.

**8.14** Частные требования

**8.14.1** Расфасованная пшеничная мука и никстамализованная кукурузная мука, с добавлением фолиевой кислоты, железа и цинка и восстановленная витамином B1, витамином B2, витамином B3, должна соответствовать следующему:

**8.14.2** Можно использовать только следующее наименование:

**i)** Пшеничная мука с добавлением фолиевой кислоты или фолацина или фолата (витамин Bc или витамин B9)\*, цинка и железа, восстановленная витамином B1 (тиамин мононитрат)\*, витамином B2 (рибофлавин)\* и витамином B3 (ниацин)\*.

**ii)** Никстамализованная кукурузная мука с добавлением фолиевой кислоты или фолацина или фолата (витамин Bc или витамин B9)\*, железа и цинка и восстановленная витамином B1 (мононитрат тиамина), витамином B2 (рибофлавин)\*, витамином B3 (ниацин)\*.

\* Термины в скобках являются необязательными.

**8.14.3** Не допускается использование наименования, отличного от того, которое указано в настоящем стандарте. Расфасованные продукты, которые содержат данные наименования в качестве сырья, могут заявлять их в списке ингредиентов как “пшеничная мука” или “никстамализованная кукурузная мука”.

**8.14.4** В случае расфасованной пшеничной муки и никстамализованной кукурузной муки следует указать содержание фолиевой кислоты, витамина B1, витамина B2, витамина B3, железа и цинка в мг на 100 г продукта.

**8.14.5** Расфасованные пшеничная и никстамализованная кукурузная мука должны указывать в списке ингредиентов источники используемого железа и цинка.

**8.14.6** При использовании аскорбиновой кислоты в расфасованной пшеничной муке она должна указываться как добавка, а не как питательное вещество.

**8.14.7** На основной поверхности упаковки никстамализованной кукурузной муки должен быть указан процесс никстамализации, которому она была подвергнута. В случае, если продукты подверглись какой-либо обработке для обеспечения их безопасности, может быть по желанию указано название такой обработки, если указание названия такой обработки согласно соответствующим нормам не является обязательным.

**8.15** Предупреждающие надписи

**8.15.1** Алкогольные напитки или продукты, содержащие этиловый спирт в количествах, превышающих 0,5%, должны включать на основной поверхности этикетки следующую надпись: “Este producto contiene \_\_\_\_\_\_ % de alcohol. No recomendable para niños”. (Этот продукт содержит \_ \_ \_ \_ \_ \_ % спирта. Не рекомендуется для детей) (В пробелах укажите содержание спирта в %.)

**8.15.2** Продукты, изготовленные из зерновых, содержащих глютен; такие как пшеница, овес, ячмень и рожь, должны включать следующую предупреждающую надпись: “este producto contiene gluten” (этот продукт содержит глютен) или подобную. с выделением глютена в списках ингредиентов (в скобках после указания соответствующего злака, являющегося его источником)

**8.15.3** Могут быть включены справочные надписи, которые способствуют здоровому питанию.

**8.16** Запрещенные заявления свойств

**8.16.1** Использование следующих заявлений запрещено:

**8.16.1.1** Свойства

**i)** Заявление о свойствах, которые предполагают, что сбалансированное питание на основе обычных продуктов не может обеспечить достаточное количество всех питательных элементов.

**ii)** Заявления, которые не могут быть проверены.

**iii)** Заявления о полезных свойствах пищевого продукта или безалкогольного напитка, предотвращающих, облегчающих или лечащих болезни, расстройства или физиологического состояния.

**iv)** Заявления о свойствах, которые могут вызвать сомнения в безопасности пищевых продуктов или безалкогольных напитков.

**v)** Заявления о свойствах, которые могут вызвать страх потребителя и использовать его в коммерческих целях.

**vi)** Заявление о свойствах, которые утверждают, что данный пищевой продукт является подходящим источником всех основных питательных веществ

**8.16.1.2** Которые вводят в заблуждение

**i)** Бессмысленные заявления о свойствах, включая сравнительные и превосходные степени.

**ii)** Заявления о свойствах надлежащей гигиенической или торговой практики, такие как: “genuinidad", "salubridad", "sanidad", “sano”, “saludable”, (“подлинность", "здоровье", “здоровый”), за исключением тех, которые указаны в других применимых правовых нормах.

**iii)** Заявления о свойствах, подтверждающих природу или происхождение пищевого продукта или безалкогольного напитка, такие, как: “natural”, “puro”, “fresco”, “fabricación casera”, “kosher”, “halal”, “orgánico" o "biológico" (“натуральный”, “чистый”, “свежий”, “домашнее производство”, “кошерный”, “халяль”, “органический" или "биологический"), за исключением случаев, когда установлено, что продукт действительно обладает этой характеристикой.

**iv)** Заявления о свойствах, которые предполагают, подразумевают или утверждают, что пищевой продукт имеет гарантированное качество, или такие надписи, как “calidad garantizada” “sello de garantía” “satisfacción garantizada” “garantía de por vida” “garantía total” “100% garantizado”, (“гарантированное качество” “гарантийная печать” “гарантированное удовлетворение” “пожизненная гарантия” “полная гарантия” “100% гарантия”), за исключением случаев, когда потребители информируются о том, из чего такой продукт состоит и как потребитель может это применить.

**8.17** Продукты, упакованные в точке продажи, должны иметь следующую информацию:

**a)** Название или наименование продукта

**б)** Заявление о содержании

**в)** Дату упаковки и, если применимо, срок годности или предпочтительного употребления **9. Внутренняя и внешняя упаковка**

**9.1** Внутренняя упаковка

**9.1.1** Расфасованные продукты, подпадающие под действие настоящего стандарта, должны быть упакованы в контейнеры, изготовленные из материалов, безвредных и устойчивых к различным этапам процесса, таким образом, чтобы они не реагировали с продуктом и не изменяли его физические, химические, сенсорные и микробиологические характеристики.

**9.1.2** Для хлебобулочных изделий, продаваемых оптом, материал, предоставляемый ответственным за продажу для упаковки, должен быть чистым и новым, изготовленным из безопасных и прочных материалов таким образом, чтобы он не реагировал с продуктом и не изменял его физические, химические или сенсорные характеристики.

**9.2** Внешняя упаковка

Следует использовать внешнюю упаковку из прочного материала, которая обеспечивает надлежащую защиту внутренней упаковки для предотвращения ее внешнего износа, а также облегчает перемещение, хранение и распространение.

**10 Соответствие международным стандартам**

Настоящий стандарт не эквивалентен международным стандартам или другим мексиканским стандартам, за исключением раздела 5.2.2, касающегося зерновой муки, манной и прочей крупы, где он частично эквивалентен:

Кодекс стандарта для пшеничной муки. Кодекс Стандарта 152-1985 (Ред. 1-1995).

**11 Библиография**

**11.1** Федеральный закон о метрологии и стандартизации. Последняя реформа. Мехико, ФО.

**11.2** Общий закон о здравоохранении. Последняя реформа. Мехико, ФО.

**11.3** Регламент санитарного контроля за продуктами и услугами. Мехико, ФО.

**11.4** Министерство торговли и промышленного развития. 1981 г. NORMA-Z-13/02. Руководство по написанию, структурированию и представлению официальных мексиканских стандартов. Мехико, ФО.

**11.5** Фернандес, Э. Э. 1981 г. Санитарная микробиология, вода и продукты питания. Том . 1. Университет Гвадалахары, Мексика. стр. 685, 883, 839 и 840.

**11.6** Фрейзер В.К. и Вестхофф Д.К. 1985 г. Микробиология пищевых продуктов. 3-е издание. Издательство Acribia, S. A. Сарагоса, Испания. стр. 379-380.

**11.7** Международная комиссия по микробиологическим спецификациям продуктов питания. 1985 г. Микробная экология пищевых продуктов. Том II. Издательство Acribia, S. A. Сарагоса, Испания. стр. 812-828.

**11.8** Справочные книги по пищевым технологиям. Переработка зерновых. UNIFEM 1994 г. стр. 1-18

**11.9** Каталан К. M. Технология зерновых. Изд. Acribia. Сарагоса Испания, 1971 г.

**11.10** *Кодекс Алиментариус*. Зерновые, бобовые, производные продукты и растительные белки. Том . 7. Второе издание 1985 г.

**11.11** Макоко П. M. К. Содержание микотоксинов в злаках для корма для животных. 1994 г. Национальный автономный университет Мексики. Факультет наук.

**11.12** Дераше Р. Токсикология и безопасность пищевых продуктов. Издательство Omega, S.A. Барселона 1990 г.

**11.13** Комиссия *Кодекс Алиментариус*. Доклад 36-ого совещания Комитета Кодекса по пищевым добавкам и загрязняющим веществам в пищевых продуктах.

**11.14** Серна С. С. Химия, хранение и индустриализация зерновых. AGT Editor, S.A. 1996 г.

**11.15** INCMSZ. Таблицы питательной ценности наиболее потребляемых продуктов питания в Латинской Америке 1996 г.

**11.16** Соединения железа для обогащения пищевых продуктов. Справочники по Латинской Америке и Карибскому бассейну 2002 года

**11.17** Льянос М. Д. Экономический анализ, июнь 2004 г., Национальное обогащение фолиевой кислотой. Программа в Чили младшего научного сотрудника Института питания и пищевых технологий (INTA) Университет Чили (октябрь 2003 г.)

**11.18** Линдси Х. А. кандидат медицинских наук Д. Статус фолиевой кислоты и витамина B12 в Америке. Обзоры питания. Том 62, номер 6 (Часть II). Июнь 2004 г.

**11.19** Уиттакер Пол. Взаимодействие железа и цинка у человека. Американское общество клинического питания. 1998:68 (Дополн.) 4425-4465

**11.20** Панамериканская организация здравоохранения. Обогащение муки железом, фолиевой кислотой и витамином B12 Отчет регионального совещания 9-10 октября 2003 г. Сантьяго, Чили.

**11.21** Панамериканская организация здравоохранения. Центры по контролю и профилактике заболеваний. Профилактика дефектов нервной трубки с помощью фолиевой кислоты

**11.22** Управление по контролю за продуктами и лекарствами. 1989 г. Свод федеральных правил. 21. ЧАСТИ 100–169 в ред. по состоянию на 1 апреля. стр. 252-265.

**11.23** Комитет Кодекса по пищевым добавкам. 19-ое совещание в Гааге, 5-11 ноября 1985 г. Информация о юридических и других административных ограничениях для загрязняющих веществ в пищевых продуктах. Приложение 1 к CX/Fa 85/18. стр. 24, 70, 81, 87, 89.

**11.24** Комиссия *Кодекс Алиментариус*. 26-30 октября 1992 г. Доклад 8-ого совещания по зерновым и бобовым культурам, Вашингтон, О. К. стр. 3.

**11.25** Комитет *Кодекса* по пищевым добавкам и загрязняющим веществам в пищевых продуктах. 22-ое совещание в Гааге, 19-24 марта 1990 года, Ориентировочные уровни для кадмия и свинца в пищевых продуктах CX/FAC 90/18 Прил. 3. 22-ое совещание в Гааге. стр. 1-5.

**11.26** Эгмонд Ван Х.П. Национальный институт общественного здравоохранения и гигиены окружающей среды. 28 сентября - 3 октября 1987 г. Нидерланды. MYC 81/9.2. стр. 25-28.

**11.27** Продовольственная и сельскохозяйственная организация объединенных наций, ВОЗ, Панамериканская организация здравоохранения 1992 г. Международная конференция по питанию. Доклад Мексики. Национальная продовольственная комиссия. Мексика, 7-ое совещание, Вашингтон, О. К. 22-26 октября 1990 г. CX/CPL 90/8-Add. 1 мая 1990 года. стр. 18, 19, 22, 23.

**11.28** Министр снабжения и обслуживания Канады. 1989 г. Департамент национального здравоохранения и социального обеспечения.
Ведомственная консолидация Закона о пищевых продуктах и лекарствах и Положений о пищевых продуктах и лекарствах. Канада. стр. 63 и 63 A.5.

**11.29** Технико-санитарные правила пищевого сектора. 1989 г. Том II. 1-ое изд. Издательство А. Madrid Vicente. Мадрид, Испания. стр. 283-293, 304, 310, 346 и 352.

**11.30** Эндрю Э. Чейзель и др. 1992 г. Профилактика первых дефектов нервной трубки за счет околозачаточного приема витаминов. Медицинский журнал Новой Англии. Том . 327.  № 26. стр. 1832-1835.

**11.31** Бурж Гектор. 1982 г. Питание и его проблемы в Мексике. Издательство C. E. C. S. A. стр. 64.

**11.32** Броуди Том и др. 1984 г. Фолиевая Кислота. Справочник витаминов. De. Laurence J. Machlin, Marcel Decker, Inc. стр. 459-496.

**11.33** Фонду М. 1980 г. Таблицы пищевых добавок. Изд. Научное издательство Elsevier, Амстердам. Нидерланды.

**11.34** Елинек Шарль Ф. 1987 г. Распределение микотоксинов: анализ всемирных данных по основным продуктам, включая данные международной объединенной программы Продовольственной и сельскохозяйственной организации объединенных наций, ВОЗ, Панамериканской организации здравоохранения по мониторингу загрязнения пищевых продуктов. Пункт 5. Продовольственная и сельскохозяйственная организация объединенных наций, ВОЗ, Программа ООН по окружающей среде, Вторая международная конференция по микотоксинам Бангкок, Таиланд. Действующие ограничения и регламенты по микотоксинам. стр. 11-15.

**11.35** Джозеф Мулинаре, доктор медицинских наук, и др., 1988 г. Околозачаточное использование поливитаминов и возникновение дефектов нервной трубки. Журнал Американской медицинской ассоциации, Том 260, № 21. стр. 3141-3145.

**11.36** Кумате Родригес, Х. и др. 1992 г. Руководство по эпидемиологическому надзору. Дефекты нервной трубки. № 16. Министерство Здравоохранения.

**11.37** Перес Эскамилья Рафаэль. 1995 г. Обогащение фолиевой кислотой для предотвращения дефектов нервной трубки: необходим консенсус в отношении потенциальных побочных эффектов. Американский журнал общественного здравоохранения, Том 85. № 11.

**11.38** Померанц И. 1989 г. Пшеница: химия и технология; Том II. Издано Американской ассоциацией химиков зерновых. Миннесота, США, стр. 118-123.

**11.39** Программа ООН по окружающей среде и ВОЗ, критерии охраны окружающей среды. 11. Микотоксины, научное издание № 453. Панамериканская организация здравоохранения. стр. 2-7.

**11.40** Университетская программа исследований в области здравоохранения. 1996 г. Национальный автономный университет Мексики.
Координация научных исследований. Первое совещание по исследованию фолиевой кислоты в дефектах нервной трубки. Отчет.

**11.41** Куалья Г. 1991 г. Хлебопекарная наука и технология. 2-ое Изд. Acribia, S. A. Сарагоса, Испания. стр. 163-217 и 392.

**11.42** Рейли Конор. 1991 г. Загрязнение пищевых продуктов металлами. 2-ое издание. Издательство Elsevier Applied Science. Великобритания. стр. 116, 137 и 154-155.

**11.43** Руис-Матус, Куаутемок и др. Эпидемиологический обзор дефектов нервной трубки в Мексике. Gac. Méd. Mex. Том . 131, № 4, стр. 485-489.

**11.44** Спайви Фокс М.Р. 1976 г. Метаболизм кадмия-А, Обзор аспектов, относящихся к оценке потребления человеком кадмия с пищей, Монография Фонда питания. Издано Прасад А.С. Глава 42. стр. 403-408.

**11.45** Новые грибы, продуцирующие микотоксины. Лурдес Абакарка, Брагулат, Кастелла, Акенси и Кабаньес. Иберо-американский журнал микологии 2000:17:563-568.

**11.46** Естественное загрязнение микотоксинами в кормовой кукурузе и зеленых кофейных зернах в штате Наярит (Мексика). Лурдес Робледо, Марин и Рамос. Иберо-американский журнал микологии 2001:18:141-144.

**11.47** Свод практических правил по снижению афлатоксина B1, присутствующего в сырье и дополнительных кормах для животных, дающих молоко. CAC/RCP 45-1997. *Кодекс Алиментариус*.

**11.48** Свод практических правил по предотвращению и снижению загрязнения зерновых культур микотоксинами с приложениями, касающимися охратоксина А, зеараленона, фумонизинов и трихотенов. CAC/RCP 51-2003. *Кодекс Алиментариус.*

**11.49** Исследование Продовольственной и сельскохозяйственной организации объединенных наций: Мировые регламенты пищевых продуктов и питания в отношении микотоксинов в продуктах питания и рационах в 2003 году. Продовольственная и сельскохозяйственная организация объединенных наций.

**11.50** Руководство по применению системы анализа опасностей и критических контрольных точек в области предотвращения и контроля микотоксинов, Продовольственная и сельскохозяйственная организация объединенных наций (ФАО) и Международное агентство по атомной энергии (МАГАТЭ).

**11.51** Общие принципы добавления необходимых питательных веществ в продукты питания CAC/GL 09-1987
(с поправками 1989, 1991) *Кодекс Алиментариус*

**12 Соблюдение стандарта**

**12.1** Контроль за соблюдением настоящего стандарта осуществляется Министерством здравоохранения в соответствии с применимыми условиями и правовыми положениями.

**13 Срок действия**

**13.1** Настоящий Официальный мексиканский стандарт вступает в силу через сто восемьдесят календарных дней с даты его публикации в Официальном вестнике Федерации.

**13.2** После вступления в силу настоящий Официальный мексиканский стандарт отменяет следующие Официальные мексиканские стандарты:

NOM-147-SSA1-1996. Товары и услуги. Зерновые и продукты из них. Зерновая мука, манная и прочая крупа. Продукты питания на основе зерновых, съедобных семян, муки, манной и прочей крупы или их смесей. Хлебобулочные изделия. Санитарно-пищевые положения и требования, а также Официальный мексиканский стандарт NOM-188-SSA1-2002 - Продукты и услуги. Контроль афлатоксинов в злаках для потребления человеком и животными. Санитарные требования, за исключением пункта 5.3.2 и Приложения А к Стандарту, опубликованные в Официальном журнале Федерации соответственно 10 декабря 1999 года и 15 октября 2002 года.

Подлинные выборы. Не переизбрание.

Вниманию

Мехико, ФО, 10 марта 2009 г.-федеральный комиссар по защите от рисков для здоровья и председатель Национального консультативного комитета по стандартизации регулирования и развитию здравоохранения **Мигель Анхель Тоскано Веласко**. - Раздел

**14. Приложения**

**Приложение I**

|  |  |
| --- | --- |
| **Виды ингредиентов** | **Общее наименование** |
| Рафинированные масла, отличные от оливкового масла | "Aceite" (Масло), в сочетании с термином "vegetal" (растительное) или "animal" (животное), обозначается термином hidrogenado (гидрогенизированное), в зависимости от случая. |
| Рафинированные жиры | "Grasas" (Жиры) в сочетании с термином "vegetal" (растительное) или "animal" (животное), в зависимости от случая. |
| Крахмалы, отличные от химически модифицированных крахмалов. | "Almidón" (Крахмал) |
| Все виды рыбного мяса, если рыба является ингредиентом другого пищевого продукта и при условии, что этикетка и внешний вид такого пищевого продукта не относятся к конкретному типу мяса рыбы. | "Pescado" (Рыба). |
| Все виды мяса птицы, если такое мясо является ингредиентом другого пищевого продукта и при условии, что этикетка и внешний вид такого пищевого продукта не относятся к конкретному типу мяса птицы. | "Carne de ave" (Мясо птицы). |
| Все виды сыров, когда сыр или смесь сыров являются ингредиентом другого пищевого продукта и при условии, что этикетка и внешний вид такого пищевого продукта не относятся к конкретному типу сыра. | "Queso" (Сыр). |
| Все специи и экстракты специй в количестве не более 2% по весу, отдельно или в пищевом продукте. | "Especia" (специя), "especias" (специи) или "mezclas de especias" (смесь специй), в зависимости от случая. |
| Все ароматические травы или части ароматических трав в количестве не более 2% по весу, отдельно или в пищевом продукте. | "Hierbas aromáticas" (ароматические травы) или "mezclas de hierbas aromáticas" (смеси ароматических трав), в зависимости от случая. |
| Все виды препаратов жевательной резинки, используемые при изготовлении основы для жевательной резинки. | "Goma de base" (основа для жевательной резинки). |
| Все моно- и дисахариды. | "Azúcares" (сахара). |
| Безводная декстроза и моногидратная декстроза. | "Dextrosa" (дектсроза) или "glucosa" (глюкоза). |
| Все виды казеинатов. | "Caseinatos" (казеинаты). |
| Масло какао, полученное под давлением или экстракцией или рафинированное. | "Manteca de cacao" (масло какао). |
| Все цукаты, не превышающие 10% от веса пищевого продукта. | "Frutas confitadas" (цукаты). |
| Все приправы в количестве не более 2% по весу, отдельно или в пищевом продукте. | "Condimentos" (приправы). |

**Приложение II**

**Взвешенное рекомендуемое ежедневное потребление (IDR) для мексиканского населения**

|  |  |
| --- | --- |
| **Питательное вещество** | **IDR** |
| Белки | 73,0 | г |
| Витамин А | 570,0 | мкг экв. ретинола |
| Витамин Е | 11,0 | мкг экв. токоферола |
| Витамин B1 (Тиамин) | 800,0 | мкг |
| Витамин В2 (Рибофлавин) | 840,0 | мкг |
| Витамин B6 (Пиридоксин) | 930,0 | мкг |
| Ниацин | 11,0 | мкг экв. ниацина |
| Кисл. Фолиевая | 390,0 | мкг |
| Витамин B12 (Кобаламин) | 2,1 | мкг |
| Витамин С (Кисл. Аскорбиновая) | 60,0 | мг |
| Кальций | 900,0 | мг |
| Медь | 650,0 | мкг |
| Фтор | 2,2 | мг |
| Фосфор | 664,0 | мг |
| Железо | 17,0 | мг |
| Магний | 250,0 | мг |
| Цинк | 10,0 | мг |

**ПРИЛОЖЕНИЕ А К СТАНДАРТУ
 ПИЩЕВЫЕ ДОБАВКИ**

**1 Зерновая мука, манная и прочая крупа**

**1.1** При производстве зерновой муки, манной и прочей крупы допускается использование следующих добавок и соадъювантов:

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавка** | **Максимальный предел мг/кг муки** |
| L-аскорбиновая кислота и ее натриевая соль\* | BPF |
| Азодикарбонамид | 45, в муке для хлеба |
| Хлор | 2,500 \*\* |
| Хлорид аммония | BPF |
| Диоксид серы | 200, только в муке для кексов и макаронных изделий |
| Диоксид хлора | 2,500 \*\* |
| Монокальцийфосфат | 2500 |
| Лецитин | 200 |
| Бензоилпероксид | 75 |
| Перекись кальция | 50 |
| Сульфат кальция | BPF |

\* Исключительное использование в качестве добавки, а не в качестве питательного вещества.

\*\* Доза для обработки

**1.2** Ферменты: при переработке продуктов, являющихся предметом настоящего раздела, могут использоваться только ферменты, перечисленные в Соглашении, и их модификации, полученные из источников, указанных в нем, и в соответствии с BPF (GMP).

**2 Продукты питания на основе зерновых, съедобных семян, муки, манной и прочей крупы или их смесей.**

При производстве продуктов питания на основе зерновых, съедобных семян, муки, манной и прочей крупы или их смесей допускается использование следующих добавок и соадъювантов

**2.1** Акцентаторы вкуса

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел мг/кг продукта** |
| 5´´ гуанилат кальция | BPF |
| 5´´ дикалий гуанилат | BPF |
| 5´´ динатрий гуанилат | BPF |
| 5´´ инозинат кальция | BPF |
| 5´´ инозинат калия | BPF |
| 5´´ динатрий инозинат | BPF |
| 5´ гуаниловая кислота | BPF |
| L глутаминовая кислота | BPF |
| Инозиновая кислота | BPF |
| Хлорид натрия | BPF |
| Декстрины | BPF |
| Глутамат натрия | BPF |
| Глутамат кальция | BPF |
| Глутамат магния | BPF |
| Глутамат моноаммония | BPF |
| Глутамат калия | BPF |

**2.2** Антиоксиданты

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел мг/кг** |
| Изоаскорбиновая кислота | BPF |
| L-аскорбиновая кислота | BPF |
| Пальмитил-6-L-аскорбиновая кислота (аскорбил пальмитат) | 200 жира\* |
| Альфа токоферол | 85 |
| Аскорбат калия | BPF |
| Третичный бутилгидрохинон (TBHQ) | 200 жира |
| Бутилгидроксианизол (BHA) | 50 |
| Бутилгидрокситолуол (BHT) | 50 |
| Пропил галлат | 100 |
| Глюконат калия | BPF |
| Изоаскорбат натрия | BPF |
| L-аскорбат кальция | BPF |
| L-аскорбат натрия | BPF |
| Смешанные токоферолы | BPF |

\* Максимальное количество использования в качестве антиоксиданта не зависит от количества, используемого в качестве питательного вещества.

**2.3** Красители

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел мг/кг продукта** |
| Желтый 2G Пищевой Желтый 5 № C.I. 18965 | 100 \* |
| Желтый "солнечный закат" FCF Желтый пищевой 3 № C.I. 15985 | 300 \* |
| Желтый пищевой 4Тартразин№ C.I. 19140 | 100 \* |
| Антоцианы | BPF |
| Азорубин и его лакиКрасный пищевой 3 и его лакиКармойзин№ C.I. 14720 | 200 |
| Синий блестящий FCFСиний пищевой 2 и его лаки№ C.I. 42090 | 100 |
| Бета-апо-8'-каротиновый альдегид Оранжевый пищевой 6 № C.I. 40820 | 30 |
| Бета-каротиновый альдегид Оранжевый пищевой 5 № C.I. 40800 | BPF |
| Кантаксантин Оранжевый пищевой 8 № C.I. 40850 | BPF |
| Сахарный колер | BPF |
| Классы I, II и III |  |
| Сахарный колер класса IV | 2500 |
| Природные каротины | 4001 1,0002 |
| Оранжевый пищевой 5 |  |
| № C.I. 75130 |  |
| Хлорофиллы |  |
| Натуральный зеленый 3 | BPF |
| № C.I.75810 |  |
| Хлорофиллин | BPF |
| Куркумин | BPF |
| № C.I. 75300 |  |
| Диоксид титана |  |
| Белый пигмент 6 | 10 000 |
| № C.I. 77891 |  |
| Эритрозин |  |
| Красный пищевой 14 | 100 \* |
| № C.I. 45430 |  |
| Экстракт аннато |  |
| (Экстракт семян *Биксы аннатовой*). | 25 |
| Натуральный оранжевый 4 |  |
| № C.I. 75120 |  |
| Экстракт кошенили |  |
| Натуральный красный 4 Кармин | 1503 |
| № C.I. 75470 |  |
| Индиготин |  |
| Синий пищевой 1 | 300 |
| № C.I. 73015 |  |
| Маслосмолы паприки или | BPF |
| экстракт паприки |  |
| Понсо 4Р |  |
| Красный пищевой 7 | 200 |
| Красный 6 |  |
| Рибофлавин | 3004 |
| Красный очаровательный АС |  |
| Красный пищевой 17 | 500 \* |
| № C.I. 16035 |  |
| Красный бетабель или красная свекла | BPF |
| Быстрый зеленый FCF |  |
| Зеленый пищевой 3 | 500 \* |
| № C.I. 42053 |  |

Алюминиевые лаки вышеупомянутых синтетических красителей могут использоваться в концентрации, не превышающей допустимую концентрацию соответствующего красителя.

\* Сумма этих искусственных красителей не должна превышать 500 мг/кг продукта.

1 только для хлопьев для завтрака

2 Смеси для теста

3 Десерты на основе злаков и крахмала

4 Хлопья для завтрака, макароны и лапша, смеси для теста и десерты

**2.4** Стабилизаторы

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел г/кг муки** |
| Альгиновая кислота | BPF |
| Агар-агар | BPF |
| Альфа-циклодекстрин | BPF |
| Альгинат аммония | BPF |
| Альгинат кальция | BPF |
| Альгинат калия | BPF |
| Альгинат натрия | BPF |
| Модифицированный крахмал | BPF |
| Карбоксиметилцеллюлоза | BPF |
| Карбоксиметилцеллюлоза натрия | BPF |
| Каррагинат аммония, калия и натрия (включая фурцеларан) | BPF |
| Каррагинан | BPF |
| Микрокристаллическая целлюлоза | BPF |
| Хлорид кальция | BPF |
| Хлорид магния | BPF |
| Хлорид калия | BPF |
| Декстрины | BPF |
| Стеароил 2-лактилат натрия или кальция | 5,000 |
| Уксусные эфиры моно- и диглицеридов жирных кислот | BPF |
| Цитрусовые эфиры моно- и диглицеридов жирных кислот | BPF |
| Эфиры диацетил винной кислоты | BPF |
| Полиглицерин эфиры жирных кислот | 10 отдельно или в сочетании с другим эфиром |
| Эфиры пропиленгликоля жирных кислот | 3,750 |
| Эфиры молочной кислоты жирных кислот | BPF |
| Гамма-циклодекстрин | BPF |
| Глюконат натрия | BPF |
| Камедь из семян рожкового дерева | BPF |
| Гуммиарабик | BPF |
| Геллановая камедь | BPF |
| Гуаровая камедь | BPF |
| Камедь карайя | BPF |
| Камедь тары | BPF |
| Камедь трагаканта | BPF |
| Ксантановая камедь | BPF |
| Гренетина | BPF |
| Гидроксипропилцеллюлоза | BPF |
| Гидроксипропилметилцеллюлоза | BPF |
| Лактитол | BPF |
| Лецитин | BPF |
| Мальтодекстрин | BPF |
| Метилцеллюлоза | BPF |
| Моно- и диглицериды жирных кислот | BPF |
| Глицерил моностеарат | BPF |
| Сорбитан моностеарат | 6,100 |
| Ацетилированные моноглицериды | BPF |
| Пектин | BPF |
| Полидекстроза А и N | BPF |
| Поливинилпирролидон | BPF |
| Соль олеиновой кислоты с кальцием, калием и натрием | BPF |
| Соли миристиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот с аммонием, кальцием, калием и натрием | BPF |
| Сорбитан триестеарат | 10,000 |

**2.5** Увлажнители

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел г/кг продукта** |
| Глицерин | BPF |
| Сорбит | 120 \* |
| Триацетин | BPF |

\* Его использование ограничено только концентрацией в качестве увлажнителя или в качестве подсластителя.

**2.6** Регуляторы рН

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел г/кг продукта** |
| Ацетат аммония | BPF |
| Ацетат кальция | BPF |
| Ацетат калия | BPF |
| Ацетат натрия | 0,07 |
| Ледяная уксусная кислота | BPF |
| Лимонная кислота | BPF |
| Соляная кислота | BPF |
| Фумаровая кислота | BPF |
| Молочная кислота | BPF |
| Яблочная кислота | BPF |
| Бикарбонат натрия | BPF |
| Бикарбонат аммония | BPF |
| Бикарбонат калия | BPF |
| Карбонат аммония | BPF |
| Карбонат кальция | BPF |
| Карбонат магния | BPF |
| Карбонат калия | BPF |
| Карбонат натрия | BPF |
| Тринатрий цитрат | BPF |
| Дикалий цитрат | BPF |
| Цитрат триаммония | BPF |
| Цитрат трикальция | BPF |
| Цитрат трикалия | BPF |
| D-L-винная кислота | BPF |
| Углекислота | BPF |
| Двухосновный фосфат кальция | 5 \* |
| Одноосновный фосфат кальция | 5 \* |
| Трехосновный фосфат кальция | 5 \* |
| Двухосновный фосфат натрия | 5 |
| Трехосновный фосфат натрия | 5 |
| Фумарат натрия | BPF |
| Глюконат кальция | BPF |
| Глюконат магния | BPF |
| Глюконо-дельта-лактон | BPF |
| Гидрогеномалат калия | BPF |
| Гидрогеномалат натрия | BPF |
| Гидроксид кальция | BPF |
| Гидроксид аммония | BPF |
| Гидроксид магния | BPF |
| Гидроксид калия | BPF |
| Гидроксид натрия | BPF |
| Лактат аммония | BPF |
| Лактат кальция | BPF |
| Лактат магния | BPF |
| Лактат калия | BPF |
| Лактат натрия | BPF |
| Малат кальция | BPF |
| Малат калия | BPF |
| Малат натрия | BPF |
| Оксид кальция | BPF |
| Пирофосфат кальция | 5 \* |
| Сульфат калия | BPF |
| Сульфат натрия | BPF |

\* Максимальное количество использования в качестве регулятора кислотности не зависит от количества, используемого в качестве потребляемого кальция.

**2.7** Консерванты

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел г/кг продукта** |
| Пропионовая кислота | BPF |
| Пропионат кальция | BPF |
| Пропионат калия | BPF |
| Пропионат натрия | BPF |

**2.8** Антикаглютинанты

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел г/кг продукта** |
| Аморфный диоксид кремния | BPF |
| Этилцеллюлоза | BPF |
| Оксид магния | BPF |
| Силикат кальция | BPF |
| Алюмосиликат | BPF |
| Алюмосиликат кальция | BPF |
| Силикат магния | BPF |
| Алюмосиликат натрия | BPF |
| Тальк | BPF |

**2.9** Упаковочный газ

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел мг/кг продукта** |
| Азот | BPF |
| Закись азота | BPF |
| Пропан | BPF |

**2.10** Секвестранты

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел мг/кг продукта** |
| Глутамат калия | BPF |
| Глутамат натрия | BPF |

**2.11** Ароматизаторы

При разработке продуктов, охватываемых этим пунктом, допускается использование ароматизаторов, указанных в Соглашении.

**3. Хлебобулочные изделия**

При разработке продуктов, указанных в этом разделе, допускается использование следующих добавок и соадъювантов:

**3.1** Акцентаторы вкуса

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел мг/кг продукта** |
| Глутаминовая кислота | BPF |
| Хлорид калия | BPF |
| Хлорид натрия | BPF |
| Этилмалтол | 100 |
| Дрожжевой экстракт *Sacharomyces cerevisae* | BPF |
| Глутамат кальция | BPF |
| Глутамат магния | BPF |
| Глутамат моноаммония | BPF |
| Глутамат калия | BPF |
| Глутамат натрия | BPF |
| Динатрий гуанилат | BPF |
| Динатрий инозинат | BPF |
| Мальтодекстрины | BPF |
| Сахароза | BPF |

**3.2** Кондиционеры для теста

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел мг/кг продукта** |
| Аскорбиновая кислота и ее соли натрия и кальция | BPF |
| Карбонат кальция | BPF |
| Хлорид аммония | BPF |
| Диоксид кремния | BPF |
| Фумарат кальция | BPF |
| Фумарат калия | BPF |
| Фумарат натрия | BPF |
| Лактат натрия или кальция | BPF |
| Метабисульфит натрия | 50 |
| Моно- и диглицериды жирных кислот | BPF |
| Оксид кальция | BPF |
| Сульфат кальция | 13 |
| Триацетин | BPF |

**3.3** Антиоксиданты

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел мг/кг жира** |
| Аскорбиновая кислота | BPF |
| Фосфорная кислота | 1300 |
| Изоаскорбиновая кислота | BPF |
| Альфа токоферол | 200 |
| Аскорбат калия | BPF |
| Метабисульфит натрия | BPF |
| Бисульфит натрия | 50 |
| Бутилгидроксианизол (BHA) | 200 |
| Бутилгидрокситолуол (BHT) | 200 |
| Пропил галлат | 100 \* |
|  | 200\*\* |
| Изоаскорбат натрия | BPF |
| Лецитин | BPF |
| Метабисульфит натрия или калия | 50 |
| Маслосмолы паприки | BPF |
| Аскорбилпальмитат | 1,000 |
| Сульфит калия или натрия | 50 |
| Тербутилгидрохинон (TBHQ) | 200 |
| Тиосульфат натрия | 50 |
| Смешанные токоферолы | BPF |

\* Обычные хлебобулочные изделия
\*\* Особая выпечка

**3.4** Красители

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел мг/кг продукта** |
| Желтый 2G |  |
| Желтый пищевой 5 | 100 |
| № C.I. 18965\* |  |
| Желтый "солнечный закат" FCF |  |
| Желтый пищевой 3 | 300 |
| № C.I. 15985\* |  |
| Желтый пищевой 4 |  |
| Тартразин | 100 |
| № C.I. 19140 |  |
| Синий блестящий FCFСиний пищевой 2 и его лаки № C.I. 42090\* | 500 |
| (только для украшений) |
| Бета-каротин |  |
| Оранжевый пищевой 5 | BPF |
| № C.I. 40800 |  |
| Кантаксантин |  |
| Оранжевый пищевой 8 | BPF |
| № C.I. 40850 |  |
| Сахарный колер | BPF |
| Классы I, II и III |  |
| Сахарный колер класса IV | 1200 |
| Натуральные каротины Оранжевый пищевой 5 № C.I. 75130 | 1,000 |
| Хлорофиллы Зеленый натуральный 3 № C.I. 75810 | BPF |
| Куркумин № C.I. 75300 | BPF |
| Диоксид титана Белый пигмент 6 № C.I. 77891 | 10 000 \*\* |
| ЭритрозинКрасный пищевой 14№ C.I. 45430\* | 100 |
| Экстракт аннато |  |
| (Экстракт семян *Биксы аннатовой*). | 10 |
| Натуральный оранжевый 4 № C.I. 75120 |  |
| Экстракт кошенили Красный натуральный 4 № C.I. 75470 | 200 |
| Экстракт оболочек виноградных ягод № C.I. N.R. | 100 |
| ИндиготинСиний пищевой 1 и его лаки№ C.I. 73015\* | 300 |
| Оксид железа желтый № C.I. 77492 | 75 |
| Оксид железа красный № C.I. 77491 | 75 |
| Оксид железа черный № C.I. 77499 | 75 |
| Понсо 4Р |  |
| Красный кошенильный А Красный пищевой 7 | 50 |
| № C.I. 16255 |  |
| Рибофлавин | 300 (хлебобулочные изделия) 1,000 (украшения) |
| Красный очаровательный AC Красный пищевой 17 | 300 |
| № C.I. 16035\* |  |
| Красный бетабель или красная свекла | BPF |
| Бета-апо-8-каротиновый альдегид |  |
| Оранжевый пищевой 6 | 30 |
| № C.I. 40820 |  |
| Быстрый зеленый FCF |  |
| Зеленый пищевой 3 | 100\* |
| № C.I. 42053 |  |

Алюминиевые лаки вышеупомянутых синтетических красителей могут использоваться в концентрации, не превышающей допустимую концентрацию соответствующего красителя.

\* При использовании смесей искусственных красителей их сумма не должна превышать 500 мг/кг продукта с соблюдением максимальной концентрации для каждого из них.

\*\* Используется исключительно в хлебобулочных изделиях с покрытием и кремовой начинкой.

**3.5** Консерванты

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел мг/кг продукта** |
| Бензойная кислота и ее натриевые соли | 1000 отдельно или в сочетании с другим разрешенным консерватором |
| Пропионовая кислота и ее натриевые и калиевые соли | BPF |
| Сорбиновая кислота и ее натриевые и калиевые соли | 1000 отдельно или в сочетании с другим разрешенным консерватором |
| Диацетат натрия | BPF |
| Эриторбат натрия | BPF |
| Пропил парабен | 1000 отдельно или в сочетании с другим разрешенным консерватором |
| Сорбат кальция | 1000 |
| Сорбат калия | 1000 |
| Сорбат натрия | 1000 |

\* При использовании смесей консервантов сумма консерваторов не должна превышать максимальный предел консерванта с более высокой концентрацией.

**3.6** Эмульсии, стабилизаторы, загустители и гелеобразующие средства

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел** |
| Агар-агар | BPF |
| Альгинат аммония, кальция, калия и натрия | BPF |
| Модифицированные крахмалы | BPF |
| Карбоксиметилцеллюлоза натрия | BPF |
| Карбоксиметилцеллюлоза | BPF |
| Каррагинаты кальция, калия или натрия | BPF |
| Каррагинан | BPF |
| Микрокристаллическая целлюлоза | BPF |
| Карнаубский воск | BPF |
| Декстрины | BPF |
| Стеароил 2-лактилат натрия или кальция | 5000 мг/кг муки |
| Уксусные эфиры моно- и диглицеридов жирных кислот | BPF |
| Эфиры глицерина с уксусной кислотой и жирными кислотами | BPF |
| Цитрусовые эфиры моно- и диглицеридов жирных кислот | BPF |
| Эфиры диацетил винной кислоты | BPF |
| Полиглицерин эфиры жирных кислот | 10000 мг/кг муки отдельно или в сочетании с другим эфиром |
| Эфиры пропиленгликоля жирных кислот | 3750 мг/кг муки |
| Эфиры сахарозы | 3750 мг/кг продукта |
| Эфиры молочной кислоты жирных кислот | BPF |
| Эфиры глицерина с молочной кислотой и жирными кислотами | BPF |
| Фосфат алюминия и натрия | 1 г/кг муки |
| Фосфат натрия | BPF |
| Гуммиарабик | BPF |
| Камедь рожкового дерева | BPF |
| Гуаровая камедь | BPF |
| Камедь карайя | BPF |
| Шеллак | BPF |
| Камедь трагаканта | BPF |
| Ксантановая камедь | BPF |
| Гренетина | BPF |
| Гидроксипропилметилцеллюлоза | BPF |
| Лецитин | BPF |
| Мальтодекстрины | BPF |
| Метилцеллюлоза | BPF |
| Метилэтилцеллюлоза | BPF |
| Моно- и диглицериды жирных кислот | BPF |
| Глицерил моностеарат | BPF |
| Сорбитан моностеарат | 6100 мг/кг муки |
| Ацетилированные моноглицериды | BPF |
| Сукцинилированные моноглицериды | 5 г/кг муки |
| Глицерил монопальмитат | BPF |
| Пектины | BPF |
| Полисорбат 60\*\* | 3,000 только для украшений |
| Полисорбат 65\*\* | 3,000 только для украшений |
| Полисорбат 80\*\* | 3,000 только для украшений |
| Соли аммония фосфатидной кислоты | BPF |
| Сорбитан триестеарат | 10,000 мг/кг муки |
| Триполифосфат натрия | BPF |

\*\* При использовании полисорбатных смесей сумма полисорбатов не должна превышать 1% при соблюдении максимальной концентрации использования для каждого из полисорбатов.

**3.7** Разрыхлители

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел мг/кг муки** |
| Винная кислота | BPF |
| Бикарбонат аммония | BPF |
| Бикарбонат калия | BPF |
| Бикарбонат натрия | BPF |
| Карбонат натрия, аммония или калия | BPF |
| Одноосновный фосфат кальция | 5000 |
| Кислый пирофосфат натрия | 2500 |
| Двойной сульфат алюминия и натрия | BPF |
| Тартрат кислоты калия | 2500 |

**3.8** Увлажнители

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел** |
| Пропиленгликоль альгинат | 5000 мг/кг продукта |
| Глицерин | BPF |
| Пропиленгликоль | 5000 мг/кг продукта |
| Сорбит\* | 300 г/кг продукта |

\* Его использование ограничено только концентрацией в качестве увлажнителя или в качестве подсластителя. Маркировка продукта, содержащего эту пищевую добавку, соответствует требованиям стандарта NOM-086-SSA1-1994 или стандарта, заменяющего его (см. ссылки).

**3.9** Закваска

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел** |
| Дрожжи | BPF |

**3.10** Регуляторы рН

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел** |
| Ацетат натрия | 70 мг/кг продукта |
| Уксусная кислота | BPF |
| Лимонная кислота | BPF |
| Соляная кислота | BPF |
| Фумаровая кислота и ее натриевые или калиевые соли | BPF |
| Молочная кислота | BPF |
| Яблочная кислота | BPF |
| Карбонат аммония | BPF |
| Карбонат кальция | BPF |
| Цитрат натрия или калия | BPF |
| Дигидрогенизированный цитрат натрия | BPF |
| Диаммонийфосфат | 9,300 |
| Двухосновный фосфат кальция | 2500 мг/кг муки |
| Двухосновный фосфат натрия | 2500 мг/кг муки |
| Диаммоний гидрогенизированный фосфат | 9300 мг/кг продукта |
| Трикальцийфосфат | 5 мг/кг |
| Гидроксид кальция | BPF |
| Гидроксид натрия | BPF |
| Лактат аммония | BPF |
| Лактат натрия или кальция | BPF |

**3.11** Антикаглютинанты

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел** |
| Оксид магния | BPF |
| Силикат кальция | BPF |
| Алюмосиликат | BPF |
| Алюмосиликат кальция | BPF |
| Силикат магния | BPF |
| Силикат натрия | BPF |
| Силикат натрия и магния | BPF |
| Тальк | BPF |

**3.12** Упаковочные газы

|  |  |
| --- | --- |
| **Добавки** | **Максимальный предел** |
| Пропан | BPF |

**3.13** Ароматизаторы

При разработке продуктов, охватываемых этим пунктом, допускается использование ароматизаторов, указанных в Соглашении.

**ПРИЛОЖЕНИЕ В. К СТАНДАРТУ ОТБОР ПРОБ ЗЕРНОВЫХ**

**Общие положения**

**1.** Отбор проб должен выполняться специалистом по выборке с помощью инструмента для отбора проб, который позволяет получить пробу. В случае продукта в мешках прибор должен доходить до центра каждого мешка, в котором отбирается проба.

**1.1** Кроме того, в случае с фабриками пробы должны быть взяты из зон нагрева. Если их не будет во время посещения, пробы будут взяты из последних зарегистрированных зон нагрева.

**1.2** У фабрик необходимо запросить температуру и влажность проб.

**1.3** В зависимости от обстоятельств должна быть зарегистрирована площадь, количество мешков или транспортных единиц выборки.

**1.4** Открытые и крытые хранилища делятся на зоны или площади, содержащие до 2000 тонн, для каждой из которых необходимо получить составную пробу.

**1.5** Одна или несколько первичных проб будут отобраны в каждой из точек отбора проб, указанных в C.3.1 в случае нерасфасованного продукта или в 2.2 в случае продукта в мешках.

**1.6** Из суммы первичных проб будет составлена ​​составная проба, которая будет гомогенизирована и должна содержать не менее 5 кг продукта.

**1.7** В зависимости от высоты хранимого объема будет произведено соответствующее количество экстракций для каждой точки отбора проб.

**Таблица 1. Глубина отбора проб**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Глубина м. | Инструмент для отбора проб | № кол-во экстракций |
| 1 | Клеточный зонд | 1 |
| 2 | Зонд для тюков, клеточный зонд | 3\* |
| 3 | Зонд для тюков, клеточный зонд | 3\* |
| 4 | Зонд для тюков. | 3\* |
| 5 | Зонд для тюков. | 3\* |

\* Первичные пробы должны быть получены с разной глубины.

**2.** Точки отбора проб.

**2.1** Зерновые, хранящиеся навалом в крытых и открытых хранилищах. Вид сверху.



**2.2** Зерновые, хранящиеся навалом в силосах. Вид сверху.



**2.2.1** Если из-за конструкции силоса невозможно отобрать первичные пробы из верхней части, они будут взяты через люки.

**2.3** Зерновые, хранящиеся в мешках.

**2.3.1** Укладки мешков должны быть идентифицированы, проба из из каждой из них должна быть отобрана в форме воображаемой буквы «М», которая должна идти от первого до последнего ряда укладки, максимальная ширина нижней части буквы «М» не должна быть больше 5 м.



Схема 3. Точки отбора проб для продукта в мешках.

**2.3.2** Проба должна быть взята из каждого мешка, через который проходят линии буквы «М», проведенные в соответствии с тем, что указано на предыдущей схеме.

**2.3.3** Минимальное количество мешков для отбора проб на партию будет соответствовать указанному в таблице 1, если количество хранимых мешков больше максимального числа, рассматриваемого в таблице, остальные будут проверены, как если бы это была другая партия.

**Таблица 2. Минимальное количество мешков для отбора проб на партию**

Количество мешков

|  |  |
| --- | --- |
| **В партии** | **Произвести отбор проб** |
| до 99 | 10 |
| 100-199 | 15 |
| 200-299 | 20 |
| 300-499 | 30 |
| 500-799 | 40 |
| 800-1299 | 55 |
| 1300-3199 | 75 |
| 3200-7999 | 115 |
| 8000-21999 | 150 |
| 22000-49999 | 225 |

**2.4** Отбор проб зерновых на транспорте.

**2.4.1** Министерства уполномочены проводить отбор проб в транспортных единицах в любое время и в любом месте.

**2.4.2** Точки отбора проб.



Схема 4. Наземные контейнеры до 30 тонн. Вид сверху.



Схема 5. Наземные контейнеры более 30 тонн. Вид сверху.

**2.5** Отбор проб при перемещении.

**2.5.1** Пробы должны быть взяты из мест или зон, где зерно перемещается, например, во время погрузки и разгрузки на открытых и закрытых складах или во время перемещения между силосами.

**2.5.2** Количество пробы, которую необходимо получить, будет составлять примерно 1 первичную пробу весом примерно 500 г на каждые 12,5 тонн до тех пор, пока не будет получена составная проба весом не менее 5 кг, а частоту введения инструмента для отбора проб можно рассчитать по следующему уравнению:

**M = t/c**

Где:

M = частота в минутах, с которой должен быть введен инструмент для отбора проб.

t = тонны, представленные каждой первичной пробой (тонна/образец).

c = пропускная способность конвейерной ленты или разгрузочная способность транспортного средства (т/мин).

**3** Отправка проб.

Пробы должны быть помещены в новые пакеты из крафт-бумаги, во избежание их разрыва, и промаркированы во время отбора проб, этикетки должны соответствовать положениям следующего формата:

**3.1** Маркировки проб.

**3.1.1** Для отбора проб из крытого хранилища.

Тип продукта

Центр:

Расположение:

Крытое хранилище №: Секция:

Дата выборки:

Час:

Примечания:

Идентификация пробы:

**3.1.2** Для отбора проб при перемещении.

Тип продукта:

Центр доставки:

Расположение:

Центр назначения:

Расположение:

Название:

Дата и время выборки:

Данные о транспортном средстве:

Идентификация пробы:

**3.2** Лабораторный отчет.
Идентификация пробы:

Центр:

Расположение:

Тип продукта:

Название крытых хранилищ, в которых производилась выборка:

Количество составных проб на крытое хранилище:

Концентрация в каждой составной пробе:

Средняя концентрация AF в каждом крытом хранилище:

Идентификация пробы: Дата проведения анализа:

Транспортное средство, на котором производилась выборка.

Центр происхождения:

Центр назначения:

Концентрация AF:

В случае, если концентрация AF больше или равна 20 мкг/кг, указать:

Дату проведения анализа:

**15.3** Приложение C к Стандарту. Методы тестирования **Содержание**

**1 Определение примесей**

**1.1** Метод определения тяжелых примесей в зерновой муке

**1.2** Метод определения легких примесей в пшеничной муке

**1.3** Метод определения легких примесей в кукурузной муке

**1.4** Метод определения легких примесей в рисовой муке

**1.5** Метод определения легких примесей в ячменной муке, овсяной муке и сухой зерновой смеси

**1.6** Определение легких примесей в пищевых продуктах на основе зерновых, съедобных семян, муки, манной и прочей крупы или их смесей

**1.7** Метод определения примесей в хлебобулочных изделиях.

**1.7.1** Метод определения легких примесей (фрагментов насекомых, целых насекомых, волос грызунов и фрагментов перьев) в хлебобулочных изделиях с фруктами и орехами.

**1.7.2** Метод определения легких примесей в белом хлебе и продуктах с высоким содержанием жира

**1.7.3** Метод определения легких примесей в хлебе с высоким содержанием клетчатки

**2 Метод определения влажности и общего сухого вещества в муке**

**3 Метод тестирования для определения афлатоксинов в злаках.**

**4 Микробиологический анализ продуктов, подпадающих под настоящий стандарт**

**4.1** Процедура подготовки и разведения проб пищевых продуктов для их микробиологического анализа.

**4.2** Метод подсчета аэробных бактерий в чашке.

**4.3** Метод подсчета общего количества колиформных микроорганизмов в чашке.

**4.4** Метод определения *сальмонеллы* в пищевых продуктах.

**4.5** Метод определения *золотистого стафилококка* в продуктах, подпадающих под настоящий стандарт

**4.6** Метод подсчета плесени и дрожжей в пищевых продуктах

**5 Метод тестирования для определения кадмия, свинца, железа и цинка в продуктах, подпадающих под настоящий стандарт, с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии.**

**6 Определение витамина B1 и B2 с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения (ВЭЖХ).**

**7 Определение ниацина Микробиологический метод**

**8 Определение фолиевой кислоты Микробиологический метод.
1 Определение примесей**

**1.1** Метод определения тяжелых примесей в зерновой муке

**1.1.1** Основные принципы.

Примесь отделяется осаждением и затем фильтруется для наблюдения под микроскопом.

**1.1.2** Реагенты и материалы.

Все приведенные ниже реагенты должны иметь аналитическую чистоту, если не указано другое требование.

При указании воды понимается дистиллированная вода.

**1.1.2.1** Реагенты.

Хлороформ (CHCl3).

Изопропанол (C3H8-OH).

Смесь глицерин - 96% этиловый спирт . 1:3

(о/о) (C3H5) (OH)3 - C2H5-OH).

(Смешайте 1 объем глицерина с 3 объемами этилового спирта)

**1.1.2.2** Материал.

Стаканы объемом 250 мл.

Полосатая фильтровальная бумага для быстрого подсчета с параллельными линиями на расстоянии примерно 5 мм друг от друга.

Воронка Бюхнера.

Колба Китазато.

Общий лабораторный материал.

**1.1.3** Оборудование.

Аналитические весы с чувствительностью 0,1 мг.

Оборудование для вакуумной фильтрации.

Стереоскопический бинокулярный микроскоп с объективами 3, 6, 7 и 10x и парными окулярами с широким полем зрения 10, 30 и 100x соответственно.

Лампа для микроскопа или эквивалентный естественный свет

**1.1.4** Процедура.

**1.1.4.1** Взвесьте по 50 г пробы в трех экземплярах в стакане объемом 250 мл.

**1.1.4.2** Добавьте CHCl3 до 1 см от края, хорошо перемешайте и дайте постоять не менее 30 мин.
За это время несколько раз перемешайте поднимающийся на поверхность слой.

**1.1.4.3** Декантируйте CHCl3 и плавающий слой на фильтровальную бумагу в воронке Бюхнера. Следите за тем, чтобы не удалить тяжелый осадок со дна стакана. Перед декантацией проследите за тем, чтобы оставшийся плавающий слой не стал настолько компактным, что затруднит эту операцию.

**1.1.4.4** Добавьте изопропанол в количестве, равном количеству хлороформа и осадка, которые остались в стакане; позвольте осадку снова осесть и декантируйте, как указано выше.

**1.1.4.5** Повторите этот процесс с равными частями смеси хлороформа и изопропанола, пока в стакане не останется очень мало вещества. Следите за тем, чтобы не декантировать какие-либо фрагменты тяжелой примеси, которые могут присутствовать.

**1.1.4.6** Отфильтруйте через полосатую фильтровальную бумагу, ополоснув осадок в стакане фракцией хлороформа или изопропанола.

**1.1.4.7** Поместите фильтровальную бумагу с осадком в чашку Петри, смоченную смесью глицерин-этиловый спирт, и оставьте там.

**1.1.4.8** Подсчитайте под микроскопом, используя достаточно сильный свет, чтобы увидеть все детали через микроскоп. Подсчитайте и исследуйте рассекающей иглой по всей поверхности бумаги, линия за линией.

**1.1.4.9** Переверните и рассмотрите каждый кусок материала, так как некоторые фрагменты не узнаваемы, если их не сдвинуть.

**1.1.4.10** Не считайте подозрительный материал (в некоторых случаях для исследования подозрительных частей полезно 30-кратное увеличение).

**1.1.4.11** Пометьте бумагу сбоку от каждого фрагмента жирным карандашом для будущих проверок и во избежание ошибочного подсчета.

**1.1.5** Укажите среднее значение 3 определений, таких как экскременты, песок и некоторые другие тяжелые примеси, обнаруженные в 50 г пробы.

**1.2** Метод определения легких примесей в пшеничной муке

**1.2.1** Основные принципы.

После подвергания пробы кислотному гидролизу материал, рассматриваемый как легкая примесь, улавливается флотацией в минеральном масле и затем удерживается на фильтровальной бумаге для наблюдения под микроскопом.

**1.2.2** Реагенты и материалы.

Все реагенты, упомянутые ниже, должны иметь аналитическую чистоту, если не указано другое требование.

При указании воды понимается дистиллированная вода.

**1.2 2.1** Реагенты.

Соляная кислота (HCl) от 36,5 до 38,0% с удельным весом 1,185 - 1,192.

3%-ная соляная кислота. Разведите 3 объема соляной кислоты в 97 объемах воды (о/о).

5%-ный раствор моющего средства (в/о).

**i)** В стакане объемом 100 мл взвесьте 5 г лаурилсульфата натрия.

**ii)** Растворите его в воде и поместите получившееся количество в объемную колбу емкостью 100 мл, несколько раз разводя водой чтобы довести до полного объема.

Легкое минеральное масло с удельным весом (24°C) 0,840 - 0,860 и вязкостью (40°C) 45 - 55 cSt.

Смесь глицерин - 96% этиловый спирт . 1:3 (о/о) (C3H5) (OH)3 - C2H5-OH)

**i)** Смешатйте 1 объем глицерина с 3 объемами этилового спирта.

**1.2.2.2** Материалы.

Стаканы объемом 100, 250, 1000 и 2000 мл.

Колба Китазато.

Воронка Бюхнера.

Перколяторная воронка или воронка Килборна.

Чашка Петри.

Рассекающая игла.

Нагревательная решетка с перемешиванием.

Полосатая фильтровальная бумага для быстрого подсчета с параллельными линиями на расстоянии примерно 5 мм друг от друга.

Общий лабораторный материал.

**1.2.3** Оборудование.

Аналитические весы с чувствительностью 0,1 мг.

Оборудование для вакуумной фильтрации.

Магнитная мешалка.

Стереоскопический бинокулярный микроскоп с объективами 3, 6, 7 и 10x и парными окулярами с широким полем зрения 10, 30 и 100x соответственно.

Лампа для микроскопа или эквивалентный естественный свет

**1.2.4** Процедура.

**1.2.4.1** Расщепите 50 г муки в трех экземплярах в стакане объемом 2000 мл с помощью 600 мл 3%-ной соляной кислоты в автоклаве в течение 5 минут при 121°C. Дайте давлению упасть до нуля и откройте вентиляционный клапан. Немедленно перелейте расщепленную массу в стакан объемом 1000 мл, промыв его 3%-ной соляной кислотой при комнатной температуре.

**1.2.4.2** Добавьте 50 мл минерального масла и перемешайте магнитной мешалкой в ​​течение 5 мин, перелейте в перколяторную воронку, удерживая стакан. Дайте постоять 30 мин и очень осторожно перемешайте стеклянной палочкой несколько раз в течение первых 10 мин.

**1.2.4.3** Слейте нижний слой примерно до 3 см от интерфазы. Промойте стенки холодной водой и дайте слоям отделиться в течение примерно 2-3 минут. Повторяйте слив и промывание водой, пока нижняя фаза не станет прозрачной. После окончательной промывки слейте слой масла в исходный стакан и промойте стенки воронки водой и этиловым спиртом.

**1.2.4.4** Добавьте 3%-ную соляную кислоту и доведите до кипения в течение 3-4 мин на нагревательной решетке. Отфильтруйте (используя воронку Бюхнера и вакуумную систему) горячий раствор через полосатую фильтровальную бумагу и аккуратно промойте стакан и воронку водой, спиртом и 5%-ным раствором моющего средства. Отфильтруйте каждую промывку отдельно через одну и ту же фильтровальную бумагу.

**1.2.4.5** Исследуйте бумагу под микроскопом, как указано в методе 1, в соответствии с пунктами 1.1.4.7 - 1.1.4.11

**1.2.4.6** Укажите среднее значение 3 определений, таких как фрагменты насекомых, волосы грызунов и некоторые другие легкие примеси, обнаруженные в 50 г пробы.

**1.3** Метод определения легких примесей в кукурузной муке

**1.3.1** Основные принципы.

После подвергания пробы кислотному гидролизу материал, рассматриваемый как легкая примесь, улавливается флотацией в минеральном масле и затем удерживается на фильтровальной бумаге для наблюдения под микроскопом.

**1.3.2** Реагенты и материалы.

Все реагенты, упомянутые ниже, должны иметь аналитическую чистоту, если не указано другое требование.

При указании воды понимается дистиллированная вода.

**1.3.2.1** Реагенты.

Соляная кислота (HCl) от 36,5 до 38,0% с удельным весом 1,185 - 1,192.

**i)** 5%-ная соляная кислота. Разведите 5 объемов соляной кислоты в 95 объемах воды (о/о).

5%-ный раствор моющего средства (о/о).

**i)** В стакане объемом 100 мл взвесьте 5 г лаурилсульфата натрия.

**ii)** Растворите его в воде и поместите получившееся количество в объемную колбу емкостью 100 мл, несколько раз разводя водой чтобы довести до полного объема.

Легкое минеральное масло с удельным весом (24°C) 0,840 - 0,860 и вязкостью (40°C) 45 - 55 cSt.

Дезодорированный керосин.

Смесь глицерин - 96% этиловый спирт . 1:3 (о/о) (C3H5) (OH)3 - C2H5-OH)

**i)** Смешатйте 1 объем глицерина с 3 объемами этилового спирта.

**1.3.2.2** Материал.

Стаканы объемом 100, 250, 1000 и 2000 мл.

Колба Китазато.

Экстракционные воронки.

Воронка Хирша.

Чашка Петри.

Рассекающая игла.

Нагревательная решетка с перемешиванием.

Полосатая фильтровальная бумага для быстрого подсчета с параллельными линиями на расстоянии примерно 5 мм друг от друга.

Общий лабораторный материал.

**1.3.3** Оборудование.

Аналитические весы с чувствительностью 0,1 мг.

Оборудование для вакуумной фильтрации.

Магнитная мешалка.

Стереоскопический бинокулярный микроскоп с объективами 3, 6, 7 и 10x и парными окулярами с широким полем зрения 10, 30 и 100x соответственно.

Лампа для микроскопа или эквивалентный естественный свет

**1.3.4** Процедура.

**1.3.4.1** Разложите по 50 г муки в трех экземплярах в стаканы объемом 1000 мл с 400 мл 5% (о/о) соляной кислоты и 20 мл минерального масла. Поставьте стакан на нагревательную решетку и доведите до кипения, постоянно перемешивая (магнитной мешалкой). Кипятите 10 мин.

**1.3.4.2** Снимите стакан с нагревательной решетки и перелейте его содержимое в экстракционную воронку. Промойте стакан и палочку 50 мл горячей воды, пропустите промывки через экстракционную воронку и отложите стакан и палочку. Заполните воронку холодной водой примерно на 3 см ниже верха.

**1.3.4.3** Дайте осесть в течение 30 мин и слейте нижний слой примерно на 5 см от интерфазы. Добавьте 25 мл керосина в воронку и слейте слой масла в отложенный стакан. Если большое количество крахмалистого материала было отделено вместе со слоем масла, гидролизуйте 100-200 мл 5%-ной соляной кислоты, прежде чем продолжить.

**1.3.4.4** Промойте стенки экстракционной воронки 5%-ным раствором моющего средства и соберите промывки в отложенный стакан. Отфильтруйте все содержимое стакана с 5%-ным раствором моющего средства через фильтровальную бумагу.

**1.3.4.5** Исследуйте бумагу под микроскопом, как указано в методе 1, в соответствии с пунктами 1.1.4.7 - 1.1.4.11.

**1.3.4.6** Укажите среднее значение 3 определений, таких как фрагменты насекомых, волосы грызунов и некоторые другие легкие примеси, обнаруженные в 50 г пробы.

**1.4** Метод определения легких примесей в рисовой муке

**1.4.1** Основные принципы.

После подвергания пробы кислотному гидролизу материал, рассматриваемый как легкая примесь, улавливается флотацией в минеральном масле и затем удерживается на фильтровальной бумаге для наблюдения под микроскопом.

**1.4.2** Реагенты и материалы.

Все реагенты, упомянутые ниже, должны иметь аналитическую чистоту, если не указано другое требование.

При указании воды понимается дистиллированная вода.

**1.4.2.1** Реагенты.

Соляная кислота (HCl) от 36,5 до 38,0% с удельным весом 1,185 - 1,192.

**i)** 5%-ная соляная кислота. Разведите 3 объема соляной кислоты в 97 объемах воды (о/о).

1%-ный раствор моющего средства (в/о).

**i)** В стакане объемом 100 мл взвесьте 1 г лаурилсульфата натрия.

**ii)** Растворите его в воде и поместите получившееся количество в объемную колбу емкостью 100 мл, несколько раз разводя водой чтобы довести до полного объема.

Легкое минеральное масло с удельным весом (24°C) 0,840 - 0,860 и вязкостью (40°C) 45 - 55 cSt.

Изопропанол (CH3)2 CHOH 40% (о/о).

Разведите 40 мл изопропанола водой в объемной колбе емкостью 100 мл и доведите до полного объема.

Смесь глицерин - 96% этиловый спирт . 1:3 (о/о) (C3H5) (OH)3 - C2H5-OH).

**i)** Смешатйте 1 объем глицерина с 3 объемами этилового спирта.

**1.4.2.2** Материал.

Стаканы объемом 100, 250, 1000 и 2000 мл.

Колба Китазато.

Воронки Бюхнера.

Перколяторная воронка или воронка Килборна.

Чашка Петри.

Рассекающая игла.

Нагревательная решетка с перемешиванием.

Полосатая фильтровальная бумага для быстрого подсчета с параллельными линиями на расстоянии примерно 5 мм друг от друга.

Сито с размером ячейки 230. Общий лабораторный материал.

**1.4.3** Оборудование.

Аналитические весы с чувствительностью 0,1 мг.

Оборудование для вакуумной фильтрации.

Магнитная мешалка.

Стереоскопический бинокулярный микроскоп с объективами 3, 6, 7 и 10x и парными окулярами с широким полем зрения 10, 30 и 100x соответственно.

Лампа для микроскопа или эквивалентный естественный свет

**1.4.4** Процедура.

**1.4.4.1.** Подготовка пробы.

**i)** Разогрейте нагревательную решетку до максимальной температуры. Поместите магнитный стержень в стакан объемом 2000 мл. Быстро добавьте 100 г пробы и 100 мл горячей воды. Добавьте 75 мл соляной кислоты и доведите горячей водой до отметки 800 мл. Сделайте это в трех экземплярах.

**ii)** Поместите горячую смесь на нагревательную решетку и активно перемешивайте ее до кипения. Кипятите в течение 5 мин.

**iii)** Перелейте горячую смесь небольшими количествами через сито с размером ячейки 230. Отложите стакан.

**iv)** Промывайте осадок, оставшийся в сите, постоянной струей горячей воды до тех пор, пока пена не перестанет образовываться и вода не станет кристально чистой.

**v)** Переложите осадок в стакан объемом 2000 мл с 40%-ным изопропанолом. Поместите в него магнитный стержень и доведите объем 40%-ным изопропанолом до отметки 800 мл. Поставьте на нагревательную решетку и доведите до кипения при постоянном помешивании. Добавьте 95 мл минерального масла и доведите до кипения в течение 3 мин.

**vi)** Закрепите разделительную воронку (перколятор) и добавьте 300 мл 40%-ного изопропанола. Перелейте горячую смесь в верхнюю часть воронки (перколятор). Промойте стакан объемом 2000 мл 40%-ным изопропанолом и опорожните промывку в разделительную воронку (перколятор). В тот же стакан добавьте 40%-ный изопропанол (около 1000 мл) до 3 см до верхней части воронки.

**vii)** Дайте постоять 5 мин и слейте содержимое до 5 см до дна масляного слоя.

**viii)** Повторяйте заполнение горячей водой с интервалом в 2 мин до тех пор, пока водная фаза не станет прозрачной.

**ix)** Слейте слой масла в стакан объемом 1000 мл. Промойте стенки разделительной воронки (перколятора) водой и 40%-ным изопропанолом, соберите промывки в тот же стакан объемом 1000 мл и, наконец, промойте 1%-ным раствором моющего средства. Отфильтруйте через полосатую фильтровальную бумагу.

**х)** Исследуйте бумагу под микроскопом, как указано в методе 1, в соответствии с пунктами 1.1.4.7 - 1.1.4.11.

**xi)** Укажите среднее значение 3 определений, таких как фрагменты насекомых, волосы грызунов и некоторые другие легкие примеси, обнаруженные в 50 г пробы.

**1.5** Метод определения легких примесей в ячменной муке, овсяной муке и сухой зерновой смеси

**1.5.1** Основные принципы

После подвергания пробы кислотному гидролизу материал, рассматриваемый как легкая примесь, улавливается флотацией в минеральном масле и затем удерживается на фильтровальной бумаге для наблюдения под микроскопом.

**1.5.2** Реагенты и материалы

Все реагенты, упомянутые ниже, должны иметь аналитическую чистоту, если не указано другое требование.

При указании воды понимается дистиллированная вода.

**1.5.2.1** Реагенты

Соляная кислота (HCl) от 36,5 до 38,0% с удельным весом 1,185 - 1,192.

**i)** 3%-ная соляная кислота. Разведите 3 объема соляной кислоты в 97 объемах воды (о/о).

Легкое минеральное масло с удельным весом (24°C) 0,840 - 0,860 и вязкостью (40°C) 45 - 55 cSt.

Смесь глицерин - 96% этиловый спирт . 1:3 (о/о) (C3H5) (OH)3 - C2H5-OH)

**ii)** Смешатйте 1 объем глицерина с 3 объемами этилового спирта.

Изопропанол (CH3)2 CHOH 40% (о/о).

**iii)** Разведите 40 мл изопропанола водой в объемной колбе емкостью 100 мл и доведите до полного объема.

Смешайте 40%-ный изопропанол и твин 80 или аналог (1: 1)

**iv)** К 40 мл твина 80 добавьте 210 мл 40%-ного изопропанола, перемешайте и отфильтруйте (необходимо приготовить пропорциональные объемы).

Смесь 40%-ного изопропанола - динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА)

**v)** Разведите 5 г динатриевой соли ЭДТА в 150 мл воды, добавьте 100 мл 40%-ного изопропанола, перемешайте и отфильтруйте (необходимо приготовить пропорциональные объемы).

Igepal (диалкилфеноксиполиэтиленоксиэтанол) или эквивалентный эмульгатор.

**1.5.2.2** Материал

Стаканы объемом 100, 600, 1000 и 2000 мл

Колба-ловушка Вильдмана объемом 1000 или 2000 мл

Воронки для порошков

Воронка Бюхнера

Колба Китазато

Чашка Петри

Сито с размером ячейки 230

Рассекающая игла

Нагревательная решетка с перемешиванием

Полосатая фильтровальная бумага для быстрого подсчета с параллельными линиями на расстоянии примерно 5 мм друг от друга.

Общий лабораторный материал.

**1.5.3** Оборудование

Аналитические весы с чувствительностью 0,1 мг

Оборудование для вакуумной фильтрации

Магнитная мешалка

Стереоскопический бинокулярный микроскоп с объективами 3, 6, 7 и 10x и парными окулярами с широким полем зрения 10, 30 и 100x соответственно.

Лампа для микроскопа или эквивалентный естественный свет

**1.5.4** Процедура

**1.5.4.1** Взвесьте в трех экземплярах 50 г пробы в стакане 2000 мл, сильным напором горячей воды (55-70°C), направленным на стенку стакана, добавьте 1 литр воды, добавьте 80 мл соляной кислоты. Если в список ингредиентов продукта входит растительное масло, добавьте 20 мл эмульгатора Igepal.

**1.5.4.2** Поставьте стакан на разогретую до максимального уровня решетку. В начале активно перемешивайте, чтобы не пригорало, затем снова осторожно перемешивайте, чтобы смешать, и нагревайте в течение 20 минут. Если продукт становится темным, уменьшите интенсивность температуры.

**1.5.4.3** Поместите содержимое стакана в сито с размером ячейки 230 и промойте его под сильной струей воды, пока вода не станет прозрачной, промойте осадок, поместив его на одну сторону сита.

**1.5.4.4** Смочите влажный осадок изопропанолом и дайте ему стечь. Сформируйте чашку из фильтровальной бумаги и оберните ее вокруг стакана 600 мл и вставьте бумажную чашку в стакан 1000 мл.

**1.5.4.5** С помощью воронки для порошка заполните колбу-ловушку 40%-ным изопропанолом, медленно наливая его на стержень для перемешивания. Дайте постоять 30 мин и уловите. Добавьте 35 мл минерального масла, осторожно перемешайте вручную в течение 30 секунд и дайте постоять 10 мин. Повторно уловите, отфильтруйте на полосатой фильтровальной бумаге.

**1.5.4.6** Исследуйте бумагу под микроскопом, как указано в методе 1, в соответствии с пунктами 1.1.4.7 - 1.1.4.11.

**1.5.4.7** Укажите среднее значение 3 определений, таких как фрагменты насекомых, волосы грызунов и некоторые другие легкие примеси, обнаруженные в 50 г пробы.

**1.6** Определение легких примесей в пищевых продуктах на основе зерновых, съедобных семян, муки, манной и прочей крупы или их смесей

**1.6.1** Основные принципы

После подвергания пробы кислотному гидролизу материал, рассматриваемый как легкая примесь, улавливается флотацией в минеральном масле и затем удерживается на фильтровальной бумаге для наблюдения под микроскопом.

**1.6.2** Реагенты и материалы

Все реагенты, упомянутые ниже, должны иметь аналитическую чистоту, если не указано другое требование.

При указании воды понимается дистиллированная вода.

**1.6.2.1** Реагенты

Соляная кислота (HCl) от 36,5 до 38,0% с удельным весом 1,185 - 1,192.

Легкое минеральное масло с удельным весом (24°C) 0,840 - 0,860 и вязкостью (40°C) 45 - 55 cSt.

Смесь глицерин - 96% этиловый спирт 1:3 (о/о)

(C3H5)(OH)3 - C2H5-OH)

**i)** Смешатйте 1 объем глицерина с 3 объемами этилового спирта.

Изопропанол (CH3)2 CHOH 40% (о/о).

**ii)** Разведите 40 мл изопропанола водой в объемной колбе емкостью 100 мл и доведите до полного объема.

Igepal (диалкилфеноксиполиэтиленоксиэтанол) или эквивалент, такой как твин.

**1.6.2.2** Материал

Стаканы объемом 100, 600, 1000 и 2000 мл

Колба-ловушка Вильдмана объемом 1000 или 2000 мл или перколятор или воронка Килборна

Воронка Бюхнера

Колба Китазато

Чашка Петри

Магнитная мешалка

Сито с размером ячейки 230

Рассекающая игла

Полосатая фильтровальная бумага для быстрого счета с параллельными линиями на расстоянии примерно 5 мм друг от друга

Общий лабораторный материал

**1.6.3** Приборы и инструменты

Нагревательная решетка с перемешиванием

Аналитические весы с чувствительностью 0,1 мг

Оборудование для вакуумной фильтрации

Стереоскопический бинокулярный микроскоп с объективами 3, 6, 7 и 10x и парными окулярами с широким полем зрения 10, 30 и 100x соответственно

Лампа для микроскопа или эквивалентный естественный свет

**1.6.4** Процедура

**1.6.4.1** Для продуктов с низким содержанием жиров или масел:

Взвесьте в трех экземплярах 50 г пробы в стакане объемом 1 или 1,5 литра (в зависимости от объема продукта), добавьте 500 мл горячей воды (55-70°C) и 40 мл HCl. Поместите на нагревательную решетку с магнитным перемешиванием, нагрейте смесь до кипения, осторожно перемешивая в течение 20 мин.

Поместите содержимое стакана в сито с размером ячейки 230 и промойте его под сильной струей воды, пока вода не станет прозрачной, промойте осадок 40%-ным изопропанолом, поместив пробу на одну сторону сита. Поместите содержимое сита в колбу-ловушку Вильдмана или верните его в исходный стакан, если будет использоваться перколятор.

**i)** Процедура с колбой-ловушкой

Доведите 40%-ным изопропанолом до объема 800 мл и добавьте 30 мл HCl, поставьте колбу на нагревательную решетку с магнитным перемешиванием. Поднимите стержень для перемешивания над уровнем жидкости, удерживая его щипцами. Опустите магнитный стержень и при осторожном помешивании кипятите пробу в течение 5 мин. Добавьте 50 мл минерального масла и перемешивайте 3 мин. Снимите колбу с нагревательной решетки и промойте ее 40%-ным изопропанолом. Дайте постоять 10 мин и ополосните горлышко колбы изопропанолом или спиртом. Отфильтруйте на полосатой фильтровальной бумаге. Рассмотрите под микроскопом.

**ii)** Процедура для перколятора или воронки Килборна

В исходном стакане доведите пробу до объема 600 мл 40%-ным изопропанолом и добавьте 25 мл HCl. Доведите до кипения при слабом помешивании, кипятите 5 мин, добавьте 50 мл минерального масла и перемешивайте 3 мин.

Поместите содержимое стакана в перколятор, ополоснув стакан 40%-ным изопропанолом.

Если осадок в сепараторе тяжелый, ресуспендируйте его стеклянной палочкой, ополаскивая ее внутри перколятора.

Дайте постоять 3 мин и слейте содержимое до 3 см до верхней части слоя масла, снова залейте горячей водой (55-70°C), повторите операцию слива, заливайте горячей водой с интервалом 3 мин, пока водная фаза не освободится от "уловленного материала".

Уберите слив. Слейте масляный слой, поместив его в исходный стакан, промывая стенки перколятора поочередно изопропанолом или горячей водой со спиртом, используя резиновый жандарм для промывки стенок.

Отфильтруйте содержимое стакана на полосатой бумаге. Рассмотрите под микроскопом.

**1.6.4.2** Для продуктов с высоким содержанием жира или масла:

Действуйте, как в 1.6.4.1, после добавления 20 мл эмульгатора (Igepal или его эквивалент).

**1.6.5** Отчет по тестированию

Укажите среднее значение 3 определений, таких как фрагменты насекомых, волосы грызунов и некоторые другие легкие примеси, обнаруженные в 50 г пробы.

**1.7** Метод определения примесей в хлебобулочных изделиях.

**1.7.1** Метод определения легких примесей (фрагментов насекомых, целых насекомых, волос грызунов и фрагментов перьев) в хлебобулочных изделиях с фруктами и орехами.

Метод кислотного гидролиза.

**1.7.1.1** Основные принципы

После подвергания пробы кислотному гидролизу материал, рассматриваемый как легкая примесь, улавливается флотацией в гептане и затем удерживается на фильтровальной бумаге для наблюдения под микроскопом.

**1.7.1.2** Реагенты и материалы

Все реагенты, упомянутые ниже, должны иметь аналитическую чистоту, если не указано другое требование.

При указании воды понимается дистиллированная вода.

**i)** Реагенты.

Соляная кислота (HCl) от 36,5 до 38,0% с удельным весом 1,185 - 1,192.

95%-ный этиловый спирт (C2H5OH) - может использоваться коммерческий спирт без денатурации.

60%-ный этиловый спирт.

В объемную колбу емкостью 1 литр добавьте 631,6 мл 95%-ного спирта и доведите до полного объема водой.

Хлороформ (CHCl3)

Гептан C7H6 - может использоваться коммерческий N-гептан с максимальным содержанием толуола 8%.

Смесь глицерин - этиловый спирт (C3H5(OH)3 C2H5OH) 1:3 о/о

Смешайте 1 объем глицерина с 3 объемами 95%-ного этилового спирта.

Раствор этилацетата (C4H8O2) - насыщенный водный раствор.

Раствор пеногасителя: Разведите 1 г пеногасителя в 20 мл раствора этилацетата, используйте супернатант и держите контейнер плотно закрытым.

**ii)** Материалы.

Стаканы объемом 100, 250, 1000 и 2000 мл.

Часовое стекло.

Объемные колбы различной емкости.

Колба-ловушка Вильдмана, состоящая из иметраза.

Колба Эрленмейера от 1 до 12 литров, снабженная резиновой поршневой пробкой, прикрепленной к концу металлического стержня.

Воронка Бюхнера.

Чашка Петри.

Рассекающая игла.

Полосатая фильтровальная бумага для быстрого подсчета с параллельными линиями на расстоянии примерно 5 мм друг от друга.

Сито c размером ячейки 140, от 5 до 8 дюймов в диаметре.

**1.7.1.3** Оборудование
Автоклав

Аналитические весы с чувствительностью 0,1 мг

Система вакуумной фильтрации

Нагревательная пластина

Стереоскопический бинокулярный микроскоп с объективами 3, 6, 7 и 10x и парными окулярами с широким полем зрения 10, 30 и 100x соответственно.

Лампа для микроскопа или эквивалентный естественный свет

**1.7.1.4** Процедура

Добавьте 225 г пробы в 2-литровый стакан, содержащий 1 литр воды и 30 мл концентрированной соляной кислоты.

Полностью смочите продукт и перемешивайте до тех пор, пока суспензия не станет практически свободной от комков. Добавьте раствор пеногасителя и накройте часовым стеклом, нагревайте 15-20 мин в автоклаве при 121°С. Дайте давлению упасть до нуля и откройте вентиляционный клапан.

Переложите расщепленную массу небольшими порциями на сито с размером ячейки 140 и тщательно промывайте порции распылительной пастой. После того, как вся проба переложена, продолжайте промывку до тех пор, пока количество осадка не перестанет уменьшаться.

После завершения промывки (без видимого крахмала без отрубей) ополосните спиртом, затем хлороформом, затем тщательно промойте спиртом и, наконец, водой.

Поместите материал на фильтровальную бумагу, если осадка мало, или в 1 или 2-литровую колбу-ловушку, если осадка много.

Используйте ложку для переноса большей части материала.

Промойте осадок на сите из емкости, содержащей 60%-ный спирт, промойте сетку постоянной струей горячей воды, собирая окончательный осадок на одном крае сита, переложите его в колбу-ловушку. Добавьте 400 или 900 мл 60%=ного спирта в зависимости от размера колбы.

Кипятите 20 мин. Охладите до 20°C и добавьте 20 или 40 мл гептана, помесите в колбу с 60%-ным спиртом и сифонируйте 2 раза.

Будьте осторожны при перемешивании и добавлении спирта, чтобы предотвратить эмульсии или включение воздуха, если осадок в колбе имеет тенденцию подниматься, перемешайте материал 2 или 3 раза.

Отфильтруйте, чтобы удержать материал, и рассмотрите его под микроскопом.

Поместите фильтровальную бумагу с осадком в чашку Петри, смоченную смесью глицерин-этиловый спирт, и оставьте там.

Подсчитайте под микроскопом, используя достаточно сильный свет, чтобы он отображал все детали через микроскоп, подсчитайте и рассмотрите с помощью рассекающей иглы по всей поверхности бумаги, линия за линией, переворачивая и исследуя каждую часть материала, так как некоторые фрагменты неузнаваемы, если их не сдвинуть.

Не считайте подозрительный материал (в некоторых случаях для исследования подозрительных частей полезно 30-кратное увеличение).

Пометьте бумагу сбоку от каждого фрагмента жирным карандашом для будущих проверок и во избежание ошибочного подсчета.

Повторите подсчет по фрагментам насекомых, волосам грызунов в 225 г пробы.

**1.7.2** Метод определения легких примесей в белом хлебе и продуктах с высоким содержанием жира

**1.7.2.1** Основные принципы

После подвергания пробы расщеплению материал, рассматриваемый как легкая примесь, улавливается флотацией в масле и затем удерживается на фильтровальной бумаге для наблюдения под микроскопом.

**1.7.2.2** Реагенты и материалы
**i)** Реагенты

Соляная кислота (HCl) от 36,5 до 38,0% с удельным весом 1,185 - 1,192.

Легкое минеральное масло с удельным весом (24°C) 0,840 - 0,860 и вязкостью (40°C) 45 - 55 cSt.

95%-ный этиловый спирт (C2H5OH) - может использоваться коммерческий спирт без денатурации.

Изопропанол (CH3)2CHOH

Раствор этилацетата (C4H8O2) - насыщенный водный раствор.

Раствор пеногасителя. Разведите 1 г пеногасителя в 20 мл раствора этилацетата, используйте супернатант и держите контейнер плотно закрытым.

Эмульгаторы. Неионные поверхностно-активные вещества, растворимые в воде, А-нонилфеноксиполи (этиленокси) этанол; Igepal CO-730 или эквивалент.

Бета-диалкилфеноксиполи (этиленокси) этанол Igepal DM-710

5%-ное моющее средство (в/о). Разведите 5 г лаурилсульфата натрия и доведите до объема 100 мл

**ii)** Материал

Стаканы объемом 100, 250, 1000 и 2000 мл

Объемные колбы различной емкости

Часовое стекло

Чашка Петри

Рассекающая игла

Перколяторная воронка или воронка Килборна

Стеклянная палочка

Сито c размером ячейки 230

Полосатая фильтровальная бумага для быстрого подсчета с параллельными линиями на расстоянии примерно 5 мм друг от друга.

**(iii)** Оборудование

Аналитические весы с чувствительностью 0,1 мг

Магнитная мешалка

Нагревательная пластина с магнитным перемешиванием

Стереоскопический бинокулярный микроскоп с объективами 3, 6, 7 и 10x и парными окулярами с широким полем зрения 10, 30 и 100x соответственно

Лампа для микроскопа или эквивалентный естественный свет

**1.7.2.3** Процедура

Добавьте 1 литр горячей воды (от 55 до 70°C) в 2-литровый стакан, добавьте 20 мл эмульгатора В и 5 мл эмульгатора А и хорошо перемешайте.

Добавьте 225 г пробы и нарежьте хлеб на кусочки размером менее 1 квадратного дюйма и хорошо перемешайте.

Расщепление может осуществляться двумя способами:

**i)** Автоклав. Добавьте при перемешивании 30 мл концентрированной соляной кислоты. Добавьте 1 мл раствора пеногасителя, нагрейте в автоклаве в течение 30 мин при 121°C, дайте давлению опуститься до 0 перед открытием вентиляционного клапана.

**ii)** Паровая баня. Добавьте при перемешивании 90 мл концентрированной соляной кислоты. Нагревайте в паровой бане 10 мин. Добавьте 1 мл раствора пеногасителя. Кипятите 15 мин на нагревательной пластине с магнитным перемешиванием, держите стакан накрытым часовым стеклом.

**iii)** Смочите сито с размером ячейки 230, двигая его зигзагом, горячей водой (от 55 до 75°C). Просейте, пока струя не станет прозрачной и пена не исчезнет. Переложите осадок, оставшийся на сите, в исходный стакан (Внимание. Не позволяйте пробе в стакане или сите остыть.) Добавьте 30 мл концентрированной соляной кислоты и разведите водой до 1 литра. Перемешайте в магнитной мешалке и доведите до кипения. Кипятите 6 мин, добавьте 50 мл минерального масла и продолжайте нагревать до возобновления кипения. Поставьте стакан на пластину для холодного нагрева с магнитным перемешиванием и перемешивайте в течение 3 мин.

**iv)** Немедленно поместите содержимое стакана в перколятор, содержащий около 250 мл воды. Промойте стакан в перколяторе и доведите объем водой до отметки 1700. Через 1 мин перемешайте содержимое перколятора стеклянной палочкой. Поместите палочку в стакан и отодвиньте ее для окончательного слива масла. Дайте постоять 2 мин. Слейте масло до отметки 250 мл и уберите слив. Заполните перколятор водой. Продолжайте слив и заполнение до тех пор, пока нижняя водная фаза не станет почти прозрачной. Слейте масло до отметки 250 мл. Слейте масло в исходный стакан. Промойте стенки перколятора не менее 50 мл воды и спирта или изопропанола. Если стенки не очистились, промойте водой и 5%-ным моющим средством. Отфильтруйте на полосатой бумаге и рассмотрите под микроскопом.

Исследуйте под микроскопом, как указано в методе 1.7.1

Сообщите о фрагментах насекомых, волосах грызунов, найденных в 225 г пробы.

**1.7.3** Метод определения легких примесей в хлебе с высоким содержанием клетчатки

**1.7.3.1** Основные принципы

После подвергания пробы расщеплению материал, рассматриваемый как легкая примесь, улавливается флотацией в масле и затем удерживается на фильтровальной бумаге для наблюдения под микроскопом.

**1.7.3.2** Реагенты и материалы.
**i)** Реагенты.

Соляная кислота (HCl) от 36,5 до 38,0% с удельным весом 1,185 - 1,192.

Легкое минеральное масло с удельным весом (24°C) 0,840 - 0,860 и вязкостью (40°C) 45 - 55 cSt.

95%-ный этиловый спирт (C2H5OH) - может использоваться коммерческий спирт без денатурации.

Изопропанол (CH3)2CHOH

Раствор этилацетата (C4H8O2) - насыщенный водный раствор.

Раствор пеногасителя. Разведите 1 г пеногасителя в 20 мл раствора этилацетата, используйте супернатант и держите контейнер плотно закрытым.

5%-ное моющее средство (в/о). Разведите 5 г лаурилсульфата натрия и доведите до объема 100 мл.

Спирто-кислотный раствор. Смешайте одну часть концентрированной соляной кислоты с 9 частями 40%-ного изопропанола.

**ii)** Материал

Стаканы объемом 100, 250, 1000 и 2000 мл.

Объемные колбы различной емкости.

Перколяторная воронка или воронка Килборна

Стеклянная палочка

Жандарм

Сито c размером ячейки 140

Полосатая фильтровальная бумага для быстрого подсчета с параллельными линиями на расстоянии примерно 5 мм друг от друга.

**(iii)** Оборудование

Автоклав

Аналитические весы с чувствительностью 0,1 мг.

Магнитная мешалка.

Нагревательная пластина с магнитным перемешиванием

Стереоскопический бинокулярный микроскоп с объективами 3, 6, 7 и 10x и парными окулярами с широким полем зрения 10, 30 и 100x соответственно.

Лампа для микроскопа или эквивалентный естественный свет

**1.7.3.3** Процедура

**i)** Добавьте 225 г пробы в 2-литровый стакан, содержащий 1 литр воды и 50 мл концентрированной соляной кислоты. Хорошо перемешайте, добавьте 1 мл раствора пеногасителя. Нагревайте в автоклаве 15 мин при 121ºС, дайте давлению опуститься до 0 перед открытием вентиляционного клапана. Пропустите расщепленную массу небольшими порциями через сито с размером ячейки 140 с промыванием горячей водой (55 - 70°C) до тех пор, пока количество осадка не перестанет уменьшаться. Поместите сито на поддон, залейте осадок слоем примерно 2 см спирта или изопропанола, дайте ему постоять 5 мин и слейте.

Повторите этот шаг 3 раза с хлороформом, затем еще 2 раза со спиртом или изопропанолом и полностью слейте. Немедленно перенесите весь осадок, оставшийся на сите, в стакан емкостью 1 литр, используя спиртово-кислотную смесь, разбавьте содержимое спиртово-кислотной смесью до прибл. 600 мл. Добавьте 50 мл минерального масла и перемешайте магнитной мешалкой в ​​течение 5 минут.

**ii)** Полностью перелейте содержимое стакана в перколятор или воронку Килборна и отложите стакан. Дайте постоять 30 мин, осторожно перемешивайте примерно каждые 5 мин длинной стеклянной палочкой в течение первых 20 мин; слейте содержимое до 250 мл. Добавьте спиртово-кислотную смесь до 3 см ниже верха и дать постоять 30 мин, перемешивая палочкой, как указано выше. Снова слейте до 250 мл. Залейте воронку холодной водой, дайте осесть примерно за 1,5 мин и слейте до 250 мл. Продолжайте слив и заполнение до тех пор, пока нижняя водная фаза не станет прозрачной и не будет свободна от суспензионного материала.

**iii)** После последней промывки слейте водно-масляную интерфазу в отложенный стакан. Немедленно промойте стенки перколятора порциями от 50 до 100 мл горячей воды, изопропанола или спирта и при необходимости 5%-ным раствором моющего средства. Отфильтруйте через полосатую фильтровальную бумагу, промывая стенки стакана порциями от 50 до 100 мл горячей воды, изопропанола или спирта и при необходимости 5%-ным раствором моющего средства. Отфильтруйте через полосатую фильтровальную бумагу, промывая стенки стакана порциями от 50 до 100 мл горячей воды, изопропанола или спирта и при необходимости 5%-ным раствором моющего средства, используя резиновый жандарм. Исследуйте под микроскопом, как указано в методе 1.7.1

Сообщите о фрагментах насекомых, волосах грызунов, найденных в 225 г пробы.

**2 Метод для определения влажности и общего сухого вещества в муке**

**2.1** Основные принципы

Когда продукт подвергается сушке в определенных условиях, он теряет вес из-за испарения содержащейся в нем воды, которая является значением влажности.

**2.2** Материал

Алюминиевые чашки диаметром 55 мм и высотой 15 мм, с крышкой.

Герметичный эксикатор с соответствующим осушителем, таким как силикагель, хлорид кальция или эквиваленты, за исключением серной кислоты.

Тигельные щипцы.

**2.3** Оборудование

Аналитические весы с чувствительностью 0,0001 мг

Сушильная печь, поддерживающая температуру 130 ± 3ºC, с отверстием для вентиляции.

**2.4** Процедура

**2.4.1** Взвесьте 2 г муки в алюминиевой чашке, которая предварительно высушена в течение часа при температуре 130 ± 3ºC и охлаждена в эксикаторе в течение часа.

**2.4.2** Поместите чашку с пробой внутрь печи и сушите в течение часа при температуре 130 ± 3ºC. Отсчет времени следует начинать с того момента, когда температура в печи с пробой достигнет 130 ± 3ºC. Чашка должна быть полуоткрыта.

**2.4.3** Через час закройте чашку внутри печи. Выньте чашку, поместите ее в эксикатор и дайте остыть, пока она не достигнет комнатной температуры (около часа).

**2.4.4** Когда чашка остынет, взвесьте ее и укажите потерю веса как влажность, а остаток муки как общее сухое вещество.

**2.5** Расчеты

|  |  |
| --- | --- |
| % влажности = |  |

% общего сухого вещества = 100 - % влажности

Где:

А = вес чашки с пробой в г

B = вес чашки с высушенной пробой в г

W = вес пробы в г

**2.6** Повторяемость

Разница между двумя последовательными результатами, полученными в одинаковых условиях для одной и той же пробы, не должна превышать ± 0,2%. В противном случае повторите определения.

**2.7** Предосторожности

Осушитель должен быть в хорошем состоянии.

**3 Метод тестирования для определения афлатоксинов в злаках. 3.1** Подготовка аналитической пробы.

**3.1.1** Взвесьте 25 г пробы и добавьте ее в стакан блендера.

**3.1.1.1** Добавьте 5 г хлорида натрия и 125 мл 60%-ного метанола аналитической чистоты.

**3.1.1.2** Взбивайте в течение одной минуты на максимальной скорости.

**3.1.1.3** Отфильтруйте через фильтровальную бумагу диаметром 24 см.

**3.1.2** Экстракция AF с помощью иммуноафинных колонок.

**3.1.2.1** Отмерьте 20 мл фильтрата и добавьте 20 мл дистиллированной воды. Смешайте и отфильтруйте через стекловолоконную бумагу.

**3.1.2.2** Отмерьте 10 или 15 мл фильтрата (в соответствии с инструкциями к используемой иммуноаффинной колонке).

**3.1.2.3** Снимите крышку с иммуноафинной колонки и пропустите фильтрат через нее со скоростью потока две капли в секунду. Соберите в емкость для осадка.

**3.1.2.4** Промойте колонку дважды, каждый раз 10 мл воды, досуха.

**3.1.2.5** Если вы использовали 10 мл фильтрата, добавьте 1 мл метанола чистоты ВЭЖХ, элюируйте и поместите его в боросиликатную ячейку.

**3.1.2.6** Если вы использовали 15 мл фильтрата, добавьте 2,3 мл метанола чистоты ВЭЖХ, элюируйте и поместите его в боросиликатную ячейку.

**3.1.2.7** Следуйте остальной части методологии, указанной в любом из методов тестирования, изложенных в разделе 3 Метод тестирования для определения афлатоксинов в зерновых

**3.2** Экстракция с помощью иммуноаффинных колонок.

**3.2.1** Основные принципы.

AF извлекаются из пробы 80%-ным метанолом, экстракт фильтруется и разбавляется водой, фильтруется и пропускается через иммуноафинную колонку, которая содержит моноклональное антитело, специфичное для AF. В этом состоянии афлатоксин соединяется с антителом колонки. Колонка затем промывается водой для удаления примесей. Затем, после пропускания метанола через колонку, AF удаляют из антитела, этот раствор измеряют на флуорометре после дериватизации разбавленным раствором брома. AF определяются количественно в общей форме.

**3.2.2** Материалы.
Иммуноафинные колонки.

Фильтровальная бумага Ø 24 см Ø Ватман № 1 или эквивалент.

Фильтровальная бумага из стекловолокна Ø 11 см Ватман № 934AH или эквивалент.

Колбы Эрленмейера 125 мл.

Стаканы объемом 100 мл.

Пластиковые воронки Ø 100 мм.

Пластиковые воронки Ø 60 мм.

Дозатор от 1 до 5 мл.

Дозатор от 5 до 10 мл.

Дозатор от 20 до 100 мл.

Пробирка 1000 мл.

Объемные пипетки по 10 мл.

Объемные пипетки по 5 мл.

Объемные пипетки по 1 мл.

Помощник по макропипетированию.

Стеклянные шприцы 10 мл.

3-х уровневые калибровочные стандарты.

Боросиликатные ячейки 12x75 мм.

Пластиковая стойка для ячеек 12x75 мм.

Подготовка калибровочных стандартов. Если у вас нет стандартов, предоставленных производителем, подготовьте калибровочный стандарт следующим образом: используйте в качестве контроля серную кислоту (H2SO4) 0.1N. В качестве стандарта АФ 20 нг используют 34 мг дигидратсульфата хинина/мл H2SO4 0.1N.

**3.2.3** Оборудование.

Высокоскоростной блендер с чашкой из нержавеющей стали или стекла 250 мл.

Ручной насос.

Смеситель вихревого типа.

Флюорометр с ксеноновой или кварцево-галогенной импульсной лампой и фильтрами возбуждения 360 Нм и излучения 450 Нм.

**3.2.4** Реагенты.
80%-ный раствор метанола.

Отмерьте 800 мл метанола аналитической чистоты и смешайте с 200 мл дистиллированной воды в градуированной пробирке емкостью 1000 мл.

Хлорид натрия.

Метанол чистоты ВЭЖХ.

Контрольный раствор 0,03%-ного брома.

**i)** 0,03%-ный раствор брома.

**ii)** Берется 1 мл контрольного раствора концентрации 0,03% и добавляется 9 мл дистиллированной воды. Приготовьте его в день использования.

Раствор PBS pH 7.3 \*.

\* Если этого требует производитель колонки.

**i)** Приготовление PBS pH 7.3. Если приготовление раствора необходимо, доступны следующие альтернативы:

**a)** Взвесьте следующие соли:
 хлорид калия 1 г.

Дигидрогенированный ортофосфат калия 1 г.

Гидрогенизированный ортофосфат натрия (безводный) 5,8 г.

Хлорид натрия 40,0 г.

Разведите соли примерно в 4,5 литрах дистиллированной воды.

Отрегулируйте рН раствора до 7.3, используя соляную кислоту (HCI) или гидроксид натрия (NaOH), если это необходимо.

Доведите окончательный объем до 5 литров и перепроверьте pH.

**б)** Возьмите одну таблетку PBS и растворите ее в 100 мл дистиллированной воды.
Раствор остается стабильными в течение месяца.

**3.2.5** Подготовка аналитической пробы.

**3.2.5.1** Взвесьте 50 г молотой пробы и поместите ее в стакан блендера.

**3.2.5.2** Добавьте 5 г хлорида натрия и 100 мл 80%-ного метанола.

**3.2.5.3** Взбивайте в течение одной минуты на максимальной скорости.

**3.2.5.4** Отфильтруйте через фильтровальную бумагу диаметром 24 см. (Фильтрат 1).

**3.2.6** Экстракция AF с помощью иммуноафинных колонок.

**3.2.6.1** Отмерьте 10 мл фильтрата и добавьте 40 мл дистиллированной воды. Смешайте и отфильтруйте через стекловолоконную бумагу (фильтрат 2).

**3.2.6.2** Отмерьте 5 мл фильтрата и добавьте 35 мл дистиллированной воды. Смешайте и отфильтруйте через стекловолоконную бумагу (фильтрат 2).

**3.2.6.3** Подсоедините иммуноаффинную колонку к кончику стеклянного шприца, прикрепленного к ручному насосу. При необходимости пропустите через колонку 20 мл PBS.

**3.2.6.4** В случае выполнения процедуры, описанной в предыдущем пункте 3.2.6.1, отмерьте 10 мл фильтрата 2 в шприц.

**3.2.6.5** В случае выполнения процедуры, описанной в предыдущем пункте 3.2.6.2, отмерьте 15 мл фильтрата 2 в шприц.

**3.2.6.6** Снимите крышку с иммуноафинной колонки и пропустите фильтрат 2 через нее со скоростью потока две капли в секунду. Соберите в емкость для осадка.

**3.2.6.7** Промойте колонку дважды, каждый раз 10 мл воды.

**3.2.6.8** Пропустите воздух через колонку до ее высыхания.

**3.2.6.9** В случае выполнения процедуры, описанной в пункте 3.2.6.4, добавьте 1 мл метанола чистоты ВЭЖХ, элюируйте и поместите его в боросиликатную ячейку.

**3.2.6.10** В случае выполнения процедуры, описанной в пункте 3.2.6.5, добавьте 2,3 мл метанола чистоты ВЭЖХ, элюируйте и поместите его в боросиликатную ячейку.

**3.3** Количественная оценка с помощью флюорометрии.

**3.3.1** Калибровка флуорометров.

Калибровка флюорометра должна выполняться в соответствии с указанием "руководства производителя".

**3.3.2** Процедура количественной оценки.

**3.3.2.1** После того, как AF были разделены в соответствии с положениями предыдущего пункта «экстракция AF с помощью иммуноаффинных колонок», выполните следующие шаги:

**3.3.2.2** Добавьте контрольный раствор 1 мл (если вы следовали пункту 3.2.6.1). или 2 мл (если вы следовали пункту 3.2.6.2).

**3.3.2.3** Перемешайте ячейку в смесителе вихревого типа (удалите все образующиеся пузырьки).

**3.3.2.4** Поместите ячейку в предварительно откалиброванный флюорометр.

**3.3.2.5** Считайте общую концентрацию AF через 60 секунд непосредственно в мкг/кг.

**3.4** Метод ВЭЖХ.

**3.4.1** Основные принципы.

AF извлекают из пробы 80%-ным метанолом, экстракт фильтруют и разбавляют водой и пропускают через иммуноафинную колонку, которая содержит моноклональное антитело, специфичное для AF B1, B2, G1 y G2. AF выделяют, очищают и концентрируют в колонке, а затем элюируют ацетонитрилом. Элюат дериватизируют трифторуксусной кислотой. AF индивидуально количественно определяют с помощью хроматографии в обратной фазе и обнаруживают с помощью флюорометрии.

**3.4.2** Материалы.

Иммуноафинные колонки.

Фильтровальная бумага Ø 24 см.

Фильтровальная бумага из стекловолокна Ø 11 см.

Колбы Эрленмейера 125 мл.

Стаканы объемом 100 мл.

Пластиковые воронки Ø 100 мм.

Пластиковые воронки Ø 60 мм.

Дозатор от 1 до 5 мл.

Дозатор от 10 до 50 м.

Цифровые микропипетки от 10 до 100 мкл; от 100 до 1000 мкл.

Фильтры для органических растворителей 47 мм с порами 0,45 мкм.

Фильтры для водных растворителей 47 мм с порами 0,45 мкм.

Оборудование для фильтрации Millipore или подобное.

Дозатор от 20 до 100 мл.

Пробирка 1000 мл.

Объемные пипетки по 10 мл.

Объемные пипетки по 5 мл.

Объемные пипетки по 1 мл.

Помощник по макропипетированию.

Стеклянные шприцы 10 мл.

Градуированная пробирка 1000 мл.

Флаконы из желтого стекла с завинчивающейся крышкой объемом 4 мл.

1-литровые стеклянные банки для хранения подвижной фазы.

Флаконы из желтого стекла объемом 1,8 мл с завинчивающейся крышкой.

Фильтры для проб из политетрафторэтилена 13 мм с порами 0,45 мкм.

Мерные колбы из желтого стекла по 50 и 100 мл.

Объемные колбы по 1 и 2 л.

Одноразовые шприцы 5 мл с иглой.

Желтые флаконы объемом 100 мл с пробками.

Кварцевые ячейки для спектрофотометра с шагом света 1 см.

Пипетки Пастера.

Объемные пипетки по 25 мл.

**3.4.3** Оборудование.

Система дегазации растворителя с помощью вакуумной мембраны, впрыска гелия или другого эквивалента.

Градиентные насосы с клапаном для смешивания четырех растворителей или изократическая насосная система.

Автоматический или ручной инжектор проб с петлей на 50 мкл или более и системой самоочистки.

Колонка ВЭЖХ C-18 4,6 x 250 мм или 4,6 x 150 мм, размер частиц 5 мкм.

Детектор флуоресценции с ксеноновой импульсной лампой и фильтрами возбуждения при 360 Нм и излучении 450 Нм.

Графикатор, интегратор данных или персональный компьютер с соответствующим программным обеспечением для управления оборудованием и обработки данных.

Гранатарные весы с точностью 0,1 г.

Водяная баня с контролируемой температурой 65°C.

Мельница для зерна.

Высокоскоростной блендер с кувшином из нержавеющей стали на 250 мл.

Ультрафиолетовый-видимый спектрофотометр, способный выполнять развертку от 330 до 370 Нм.

**3.4.4** Подготовка реагентов.

Вода чистоты ВЭЖХ, отфильтрованная через поры 0,45 мкм.

Ацетонитрил чистоты ВЭЖХ, отфильтрованный через поры 0,45 мкм.

Метанол чистоты ВЭЖХ, отфильтрованный через поры 0,45 мкм.

Подвижная фаза: вода 60%, ацетонитрил 20%, метанол 20% - для колонки 4,6 x 250 мм, и вода 70%, ацетонитрил 12% и метанол 18% - для колонки 4,6 x 150 мм. Пропорции подвижной фазы можно регулировать, чтобы получить хорошее разрешение AF.

Трифторуксусная кислота.

Дистиллированная вода.

Ледяная уксусная кислота.

Дериватизирующий раствор.

Смешайте 10 мл трифторуксусной кислоты, 5 мл ледяной уксусной кислоты и 35 мл дистиллированной воды. Отфильтруйте через поры 0,45 мкм.

Бензол спектрометрической чистоты.

Ацетонитрил спектрометрической чистоты.

Сертифицированные индивидуальные стандарты AFB1, B2, G1 и G2 на кристаллах или пленках.

Смесь бензол-ацетонитрил (98+2).

Отмерьте 98 мл бензола и смешайте с 2 мл ацетонитрила. Держите в плотно закрытом флаконе из желтого стекла.

Концентрированная серная кислота.

Дихромат калия.

Раствор серной кислоты 0,018 N.

Разведите 1 мл концентрированной серной кислоты водой до 2 л.

Стандартные растворы дихромата калия.

Приблизительно 0,25 мМ. Взвесьте ровно 78 мг дихромата калия, предварительно высушенного в печи при 100-105° С в течение 2 ч, и доведите до 1 л, добавив 0,018 М серной кислоты.

**i)** Приблизительно 0,125 мМ. Разведите 25 мл раствора 0,25 мМ в 50 мл серной кислоты 0,018 М.

**ii)** Приблизительно 0,0625 мМ. Разведите 25 мл раствора 0,125 мМ в 50 мл серной кислоты 0,018 М.

**3.4.5** Подготовка стандартных растворов AF.

**3.4.5.1** Введите с помощью одноразового шприца и без открытия флаконов, содержащих афлатоксин, примерно 4 мл смеси бензола: ацетонитрил 98 + 2. Размешайте в вихревой мешалке до полного растворения.

**3.4.5.2** Очень осторожно откройте каждый из флаконов и поместите содержимое в мерную колбу объемом
 100 мл. Добавьте смесь бензола: ацетонитрил (приблизительная концентрация 100 мкг/мл).

**3.4.5.3** Отмерьте ровно 10 мл этого раствора и доведите до 100 мл бензолом: ацетонитрил 98+2 (приблизительная концентрация 10 мкг/мл).

**3.4.5.4** Перелейте вышеуказанные растворы во флакон из желтого стекла с должным образом маркированной пробкой и держите в морозильной камере до использования.

**3.4.6** Получение спектра поглощения.

**3.4.6.1** Дайте каждому из стандартных растворов приблизительно 10 мкг/мл уравновеситься при комнатной температуре.

**3.4.6.2** Откалибруйте спектрофотометр при 0 оптической плотности, используя раствор бензола: ацетонитрил 98 + 2 в качестве холостого опыта.

**3.4.6.3** Сканируйте каждый раствор в диапазоне от 330 до 370 Нм и получите значение
оптической плотности при максимальной длине поглощения, которая должна быть близка к 350 Нм.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Афлатоксин** | **Максимальная оптическая плотность (а)** | **Молекулярный вес (PM)** | **Коэффициент ослабления (CE)** |
| B1 |  | 312 | 19,800 |
| B2 |  | 314 | 20,900 |
| G1 |  | 328 | 17,100 |
| G2 |  | 330 | 18,200 |

**3.4.6.4** Верните растворы каждого AF в исходный флакон.

**3.4.6.5** Расчет концентрации.

мкг AF/мл = A x PM x 1000 x FC CE

где:

FC = коррекционный коэффициент (см. инструкции для расчета коррекционного коэффициента). Каждый из растворов должен иметь концентрацию от 8 до 10 мкг/мл. **3.4.7** Расчет коррекционного коэффициента (FC).

**3.4.7.1** Откалибруйте спектрометр при 0 оптической плотности, используя серную кислоту 0,018 N в качестве холостого опыта.

**3.4.7.2** Определите оптическую плотность трех растворов дихромата калия от самой низкой до самой высокой концентрации на длине волны максимального поглощения, которая должна быть близкой к 350 Нм.

**3.4.7.3** Заполните следующую таблицу полученными значениями оптической плотности и выполненными расчетами:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Раствор Дихромат калия (мМ)** | **Оптическая плотность при 350 Нм (а)** | **CE= Ax 1000/мМ** |
| 0,25 |  |  |
| 0,125 |  |  |
| 0,0625 |  |  |
|  |  | Средний CE = |

**3.4.7.4** Вычислите коррекционный коэффициент (FC), применив следующее уравнение:

|  |  |
| --- | --- |
| FC = | **e** средний |
| 3160 |

где:

3160-коэффициент ослабления (CE) для растворов дихромата калия.

Значение FC должно быть в диапазоне от 0,95 до 1,05, в противном случае проверьте инструмент или метод для определения и устранения причины.

**3.4.8** Подготовка исходного раствора AF 1000 нг/мл.

Из отдельных исходных растворов AF известной концентрации (10 мкг/мл) отмерьте количества в микролитрах, соответствующие 500 нг B1, 300 нг B2, 100 нг G1 и 100 нг G2, чтобы получить 50 мл требуемого раствора. Добавьте 50 мл раствора бензола: ацетонитрил (98+2) и перемешайте. Держите во флаконе из желтого стекла с точной маркировкой в морозильной камере. Каждый мкл раствора равен одному нг общего AF.

**3.4.9** Приготовление рабочих стандартных растворов.

Отмерьте 20, 50, 100, 150 и 200 мкл исходного раствора (1000 нг/мл) во флаконах из желтого стекла. Выпарите досуха азотом. Добавьте 1 мл ацетонитрила чистоты ВЭЖХ. Перемешайте и держите в морозильной камере до использования.

**3.4.10** Стандартная кривая AF в нг/мл.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **AF** | **B1** | **B2** | **G1** | **G2** | **Общая** |
| конц. 1 | 10 | 2 | 6 | 2 | 20 |
| конц. 2 | 25 | 5 | 15 | 5 | 50 |
| конц. 3 | 50 | 10 | 30 | 10 | 100 |
| конц. 4 | 75 | 15 | 45 | 15 | 150 |
| конц. 5 | 100 | 20 | 60 | 20 | 200 |

**3.4.11** Подготовка проб.

После того, как AF были отделены в соответствии с положениями пункта 3.2.6, выполните следующие действия:

**3.4.11.1** Добавьте ацетонитрил 1 мл (если проводилась процедура, описанная в пункте 3.2.6.1) или 1,5 мл (если проводилась процедура, описанная в пункте 3.2.6.2).

**3.4.11.2** Элюируйте и соберите во флакон из желтого стекла. Держите в морозильной камере до использования.

**3.4.12** Дериватация AF B1 и G2.

**3.4.12.1** Выньте из морозильной камеры стандартные рабочие смеси и подготовленные пробы. Доведите до комнатной температуры.

**3.4.12.2** Отмерьте 200 мкл каждого из них и добавьте 700 мкл дериватизирующего раствора, все во флаконе объемом 1,8 мл. Смешайте в течение 30 сек.

**3.4.12.3** Инкубируйте при 65°C в течение 10 мин на водяной бане.

**3.4.12.4** Остудите струей воды. Отфильтруйте через фильтр для проб 0,45 мкл.

**3.4.12.5** Держите в морозильной камере до использования.

**3.4.13** Кондиционирование жидкостного хроматографа.

**3.4.13.1** Включите все компоненты хроматографической системы.

**3.4.13.2** Установите следующие хроматографические параметры в соответствии с инструкциями по эксплуатации оборудования:

Подвижная фаза:

Для колонки 4,6 x 250 мм: вода 60%, ацетонитрил 20%, метанол 20%.

Для колонки 4,6 x 150 мм: вода 70%, ацетонитрил 12%, метанол 18%.

Расход: 1 мл/мин.

Объем инъекции: 50 мкл.

Время анализа: 15 мин.

Детектор флуоресценции:

Возбуждение: 360 Нм.

Излучение: 440 Нм.

**3.4.13.3** Отрегулируйте ослабление и коэффициент отклика детектора, чтобы получить оптимальную чувствительность.

**3.4.13.4** Очистите насосы системы каждым из компонентов подвижной фазы, используя скорость потока 10 мл/мин. Соберите около 20 мл.

**3.4.13.5** Запустите подвижную фазу по всей системе со скоростью 1 мл/мин, пока не получите стабильную базовую линию (около 30 мин).

**3.4.14** Кондиционирование метода.

**3.4.14.1** Введите 50 мкл стандартной дериватизированной рабочей смеси, эквивалентной 100 нг/мл общего AF.

**3.4.14.2** Проверьте хорошее разрешение 4 AF, а также оптимизируйте время запуска (около 15 минут). AF элюируют в следующем порядке: G1, B1, G2 y B2. Рассмотрим время удержания каждого афлатоксина.

**3.4.14.3** Введите в трех экземплярах 50 мкл каждой из пяти стандартных рабочих смесей.

**3.4.14.4** Получите и распечатайте хроматограмму каждой из них.

**3.4.14.5** Постройте график зависимости концентрации каждого афлатоксина от полученной средней площади пика. Вычислите с помощью линейной регрессии наклон, коэффициент корреляции и ординату начала координат каждого из графиков.

1. мкл исходного раствора общим объемом 1000 нг/мл.

2. Количество AFG1 в нг.

3. Средняя площадь пика AFG1 в нг.

4. Количество AFB1 в нг.

5. Средняя площадь пика AFВ1 в нг.

6. Количество AFG2 в нг.

7. Средняя площадь пика AFG2 в нг.

8. Количество AFB2 в нг.

9. Средняя площадь пика AFB2 в нг.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** |
| 20 | 6 |  | 10 |  | 2 |  | 2 |  |
| 50 | 15 |  | 25 |  | 5 |  | 5 |  |
| 100 | 30 |  | 50 |  | 10 |  | 10 |  |
| 150 | 45 |  | 75 |  | 15 |  | 15 |  |
| 200 | 60 |  | 100 |  | 20 |  | 20 |  |

**3.4.15** Инъекция проб.

**3.4.15.1** Введите 50 мкл каждой из производных проб.

**3.4.15.2** Получите и распечатайте хроматограмму каждой из них.

**3.4.15.3** Определите каждый из AF, сравнивая время удержания с временем, полученным для каждого из стандартов.

**3.4.15.4** Получите значение площади каждого AF в пробе.

**3.4.16** Выражение результатов.

мкг/кг AF в пробе = площадь пика - ордината начал координат х 1 или 1,5 х ожидаемое

разведение

1 или 1,5 применяется в зависимости от количества ацетонитрила, добавленного в элюат. Результатом будет сумма значений различных AF.

**3.4.17** Очистка хроматографической системы.

**3.4.17.1** По завершении анализа выключите автоматический детектор и инжектор.

**3.4.17.2** Прокачивайте ацетонитрил или метанол полчаса.

**3.4.17.3** Затем выключите насосную систему и компьютер.

**3.4.18** Процедуры очистки и дезинфекции стеклянного материала и рабочей зоны для определения афлатоксинов.

**3.4.18.1** Цель.

Установить руководящие принципы дезинфекции используемого материала, оборудования и рабочей зоны, а также процедуры, которым следует следовать в случае разливов и остатков экстрактов из проб.

**3.4.18.2** Общие положения.

Работы по очистке и дезинфекции будут выполняться обученным персоналом с защитным снаряжением, таким как халат, водонепроницаемые перчатки и защитные очки.

**3.4.18.3** Дезинфекция лабораторного материала.

Весь стеклянный материал, который использовался в ходе анализа, должен быть погружен в раствор гипохлорита натрия, который готовится путем разбавления одной части коммерческого раствора гипохлорита (в концентрации от 5 до 6%) десятью частями воды.

После обработки материал следует обильно промыть проточной водой, затем дистиллированной водой и дать стечь до высыхания или высушить в печи при 90-100°C.

**3.4.18.4** Дезинфекция рабочей зоны.

Поверхности рабочих зон после анализа следует протереть одноразовым полотенцем, пропитанным раствором гипохлорита натрия.

**3.4.18.5** Дезинфекция одноразового материала.

Весь одноразовый материал должен быть погружен минимум на 5 мин в раствор гипохлорита натрия. Использованный для дезинфекции раствор следует утилизировать в канализацию, а одноразовые материалы следует упаковать в герметичный пластиковый пакет, который будет помещен в контейнер для отходов.

**3.4.18.6** Устранение разливов.

Разливы растворов AF следует немедленно обработать гипохлоритом натрия, выливая его прямо из емкости, собирая жидкости промокательной бумагой, которая также будет помещена в полиэтиленовый пакет.

**3.4.18.7** Обработка остатков экстракта проб.

После удаления аликвоты экстракта пробы обычно остается ее остаток. Эти остатки экстрактов должны быть обработаны количеством гипохлорита натрия, равным единице объема обрабатываемого остатка. Полученные жидкости необходимо собрать в контейнер для жидких отходов и утилизировать в специально предназначенном для них месте.

**4 Микробиологический анализ продуктов, подпадающих под настоящий стандарт**

**4.1** Процедура подготовки и разведения проб пищевых продуктов для их микробиологического анализа.

**4.1.1** Введение

Настоящий стандарт предназначен для предоставления общих рекомендаций по приготовлению разведений для микробиологического исследования пищевых продуктов. Учитывая большое количество продуктов в этой области применения, эти рекомендации могут быть неуместными для некоторых из них, а для других могут потребоваться другие методы. Однако во всех случаях, когда это возможно, рекомендуется придерживаться этих рекомендаций и изменять их только при необходимости.

Целью первичного разведения является получение как можно более равномерного распределения микроорганизмов, содержащихся в пробе, предназначенной для анализа.

При необходимости приготовление дополнительных десятичных разведений предназначено для уменьшения количества микроорганизмов в единице объема, чтобы после инкубации можно было наблюдать за тестом в случае с пробирками или колбами и подсчитывать колонии в случае с чашками.

**4.1.2** Реагенты и материалы

**4.1.2.1** Реагенты

Приведенные ниже реагенты должны быть аналитической чистоты. При указании воды понимается дистиллированная вода.

Подготовка реагентов.

Раствор гидроксида натрия 1,0 N

|  |
| --- |
| **ФОРМУЛА** |
| **ИНГРЕДИЕНТЫ** | **КОЛИЧЕСТВА** |
| Гидроксид натрия | 4,0 г |
| Вода | 100 мл |

Приготовление:

Разведите гидроксид натрия водой до 100 мл.

Растворы разбавителей

Фосфатный регуляторный раствор (концентрированный раствор).

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Одноосновный фосфат натрия | 34,0 г |
| Вода | 1,0 л |

Приготовление:

Разведите фосфат в 500 мл воды и отрегулируйте рН до 7,2 раствором гидроксида натрия 1,0 N.

Доведите водой до литра.

Стерилизуйте в течение 15 минут при 121° ± 1,0°C.

Держите в холодильнике (концентрированный раствор).

Возьмите 1,25 мл концентрированного раствора и доведите водой до одного литра (рабочий раствор).

Распределите порциями по 99,90 и 9 мл по мере необходимости.

Стерилизуйте при 121° ± 1,0°C в течение 15 минут.

После стерилизации рН и конечные объемы рабочего раствора должны быть равны начальным.

Пептонированная вода

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Пептон | 1,0 г |
| Хлорид натрия | 8,5 г |
| Вода | 1,0 л |

Приготовление:

Разведите компоненты в литре воды.

Отрегулируйте рН до 7 ± 0,1 с помощью гидроксида натрия 1,0 N.

Распределите порциями по 99,90 и 9 мл или в любом объеме, кратным девяти по мере необходимости.

Стерилизуйте при 121° ± 1,0°C в течение 15 минут.

После стерилизации рН и конечные объемы рабочего раствора должны быть равны начальным.

Если этот разбавитель не используется сразу, храните его в темном месте при температуре от 0 до 5°C не дольше месяца в условиях, при которых не изменяется его объем или состав.

**4.1.2.2** Материалы

Бактериологические пипетки для распределения по 10 и 1 мл (или при необходимости по 1 мл и 2 мл), с ватным тампоном. Пипетки могут быть градуированы в объемах, равных одной десятой от их общего объема.

Флаконы из желтого стекла объемом 250 мл с завинчивающейся крышкой.

Пробирки 16 x 150 мм с завинчивающейся крышкой.

Стерилизуемая посуда для отбора проб: ножи, пинцет, ножницы, ложки, шпатели и т. д.

Все материалы и инструменты, контактирующие с исследуемыми пробами, должны быть простерилизованы в:

Печи в течение 2 ч при 170 - 175°C или 1 ч при 180°C, или в автоклаве в течение 15 минут при не менее 121 ± 1,0°C.

Стеклянный материал может быть заменен одноразовым материалом, который соответствует желаемым требованиям. Стеклянную посуду, поврежденную в результате многократной стерилизации, использовать нельзя, она должна быть химически инертной.

**4.1.3** Приборы и инструменты

Печь для стерилизации, достигающая минимальной температуры 170°C.

Автоклав с термометром и манометром, откалиброванный с помощью термометра до минимума и максимума.

Водяная баня с контролем температуры и механической циркуляцией, снабженная калиброванным термометром с делениями 0,1°C и поддерживающая температуру 45 ± 0,5°C.

Одно-или двухскоростной блендер, управляемый реостатом или перистальтическим гомогенизатором (стомахером).

Стерилизуемые стаканы для блендера с крышкой или стерильные пакеты для перистальтического гомогенизатора.

Гранатарные весы с точностью 0,1 г.

**4.1.4** Процедура

**4.1.4.1** Подготовка первичного разведения.

Замороженные пробы изначально жидких или разжижаемых пищевых продуктов полностью растопите на водяной бане при температуре от 40 до 45°C в течение максимум 15 минут и гомогенизируйте при активном помешивании.

Для получения жидкой части гетерогенной пробы, которая считается достаточно показательной для всей пробы (например, водная фаза животных и растительных жиров).

**i)** Перемешайте пробу вручную 25 движениями сверху вниз по дуге 30 см в течение 7 секунд. Возьмите 1 мл пробы и разведите в 9 мл разбавителя, который должен находиться при температуре, аналогичной температуре пробы, избегая контакта между пипеткой и разбавителем.

**ii)** Если количество пробы позволяет, берут аликвоты большего размера, например объемы 10 или 11 мл, разведенные в 90 или 99 мл, таким же образом, как описано выше.

**4.1.4.2** Твердые или полутвердые пробы.

Замороженные твердые и полутвердые пробы следует размораживать в холодильнике при температуре от 4 до 8ºC в течение 18 часов и не более 24 часов перед анализом.

**i)** Взвесьте 10 или 11 г пробы для анализа в стерильном контейнере или пластиковом пакете подходящего размера.

**ii)** Добавьте от 90 до 99 мл разбавителя, доведенного до температуры, аналогичной температуре пробы.

**iii)** Включите блендер или перистальтический гомогенизатор на 1-2 минуты до получения полной и гомогенной суспензии, как указано в соответствующей методике для каждого пищевого продукта. Даже у самого медленного оборудования это время не должно превышать 2,5 минуты.

**iv)** Дайте крупным частицам осесть и возьмите желаемое количество, взяв его из верхних слоев суспензии.

Если первичное разведение очень вязкое или липкое, добавьте еще разбавителя, что необходимо учитывать при последующих операциях или выражении результатов. Перистальтический гомогенизатор (стомахер) может не подходить для некоторых продуктов (например, продуктов с острыми частицами или составляющими, которые трудно диспергируются). Его следует использовать только тогда, когда есть доказательства (опубликованные или сравнительные испытания), что полученные результаты существенно не отличаются от результатов, полученных с помощью блендера.

**4.1.4.2** Подготовка дополнительных десятичных разведений.

**i)** Перенесите 1 мл или несколько, например, 10 или 11 мл первичного разведения 1 + 9 (10-1), в другой контейнер, содержащий в девять раз больший объем стерильного разбавителя при соответствующей температуре, избегая контакта между пипеткой и разбавителем.

**ii)** Тщательно перемешивайте каждый флакон с разбавителем всегда таким же образом, как описано в подпункте i) пункта 4.1.4.1.

**iii)** Выбор разведений, которые необходимо приготовить, и тех, которые должны быть засеяны, зависит от ожидаемого количества микроорганизмов в пробе, основанного на результатах предыдущих анализов и информации, полученной от проверяющего персонала, который их собирал. При полном отсутствии информации работайте с разведениями с первого по шестое.

**iv)** Используйте разные пипетки для каждого разведения, одновременно засевая выбранные чашки. Переносимый объем никогда не должен быть меньше 10% от общей емкости пипетки.

**v)** Если пипетка является конечной и переносится объем жидкости, эквивалентный ее полной вместимости, опорожните ее, приложив кончик пипетки только один раз к участку чашки Петри без жидкости.

**vi)** Во время забора жидкости в пипетку кончик пипетки должен находиться внутри горлышка флакона и удерживаться в вертикальном положении, флакон должен наклоняться по мере необходимости.

В исследованиях, направленных на выявление наличия или отсутствия определенных видов микроорганизмов в 0,1 мл или 0,1 г, нет необходимости готовить большие разведения.

Критерием выбора разведений для приготовления в соответствии с ожидаемым количеством микроорганизмов является:

Для наиболее вероятного числового метода используйте три пробирки: где можно продемонстрировать микроорганизм в 10 мл самого высокого разведения.

Для метода подсчета в чашке рассмотрите те, в которых можно подсчитать от 25 до 250 колоний как минимум в одном из трех разведений по методу подсчета аэробных бактерий в чашке. В случае других микробных групп рассмотрите указанное количество колоний в соответствующем Официальном мексиканском стандарте.

**4.1.4.3** Продолжительность процедуры.

Как правило, разведения пробы следует готовить непосредственно перед анализом, и их следует использовать для засевания культуральной средой в течение 20 минут после приготовления.

**4.2** Метод подсчета аэробных бактерий в чашке.

**4.2.1** Введение

Когда необходимо исследовать содержание жизнеспособных микроорганизмов в пищевом продукте, обычно используется метод подсчета в чашке. На самом деле этот метод не претендует на выявление всех присутствующих микроорганизмов. Разнообразие видов и типов, которые можно различить по их потребностям в питании, температуре, необходимой для их роста, доступному кислороду и т. д., делает подсчитанное количество колоний оценочным показателем фактического присутствия и отражает адекватность санитарного обращения с продуктом.

Кроме того, количество термофильных, психрофильных и психотрофных веществ важно для прогнозирования стабильности продукта при различных условиях хранения.

Чтобы получить воспроизводимые и, следовательно, значимые результаты, первостепенное значение имеет добросовестное следование и тщательный контроль условий.

Этот метод может быть применен для оценки жизнеспособных микроорганизмов в самых разных продуктах питания.

**4.2.2** Основные принципы

Основа метода заключается в подсчете колоний, которые развиваются в выбранной среде после определенного времени и температуры инкубации, при условии, что каждая колония происходит от микроорганизма исследуемой пробы. Этот метод поддерживает множество источников вариаций, некоторые из которых управляемы, но подвержены влиянию различных факторов.

**4.2.3** Реагенты и материалы
**4.2.3.1** Реагенты

Приведенные ниже реагенты должны быть аналитической чистоты.

При указании воды следует понимать дистиллированную воду с рН, близким к нейтральному.

Культуральная среда.

Триптонный агар с дрожжевым экстрактом (агар для стандартных количеств).

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Дрожжевой экстракт | 2,5 г |
| Триптон | 5,0 г |
| Декстроза | 1,0 г |
| Агар | 15,0 г |
| Вода | 1,0 л |

Подготовка культуральной среды.

Разведите компоненты обезвоженной среды в одном литре воды. Кипятите до полного растворения.

Разлейте по стерилизуемым стеклянным контейнерам вместимостью не более 500 мл в количествах, составляющих примерно половину их объема. Стерилизуйте в автоклаве при температуре 121 ± 1,0°С в течение 15 минут. Конечный pH среды должен составлять 7,0 ± 0,2 при 25ºC.

Если культуральная среда должна использоваться немедленно, предварительно охладите ее до 45ºC ± 1,0 ºC на водяной бане и держите ее при этой температуре до использования. Среда не должна растапливаться более одного раза.

В случае обезвоженной среды следуйте инструкциям производителя.

Вышеуказанная культуральная среда является наиболее широко используемой. Для некоторых конкретных пищевых продуктов требуется специальная культуральная среда, которая должна быть указана при описании метода для такого пищевого продукта.

**4.2.3.2** Материалы

Все материалы, которые контактируют с пробами или микроорганизмами, должны быть стерильными.

Требуются материалы, указанные в разделе 4.1 Подготовка и разведение проб пищевых продуктов для микробиологического анализа.

**4.2.4** Приборы и инструменты

В дополнение к упомянутым в 4.1 Подготовка и разведение проб пищевых продуктов для микробиологического анализа, необходимо следующее:

Инкубатор с термостатом, чтобы избежать отклонений выше ± 1,0 ºC, снабженный калиброванным термометром.

Счетчик колоний в темном поле с достаточным освещением, клетчатой ​​стеклянной чашкой и увеличительной линзой.

Механический или электронный регистратор.

Оптический микроскоп.

Водяная баня с или без механической циркуляции, снабженная калиброванным термометром с делениями 0,1°C и поддерживающая температуру 45 ± 0,5°C.

**4.2.5** Подготовка пробы

Чтобы подготовить пробу, следуйте пункту 4.1 Подготовка и разведение проб пищевых продуктов для микробиологического анализа.

**4.2.6** Процедура

**4.2.6.1** Разложите стерильные чашки на рабочем столе так, чтобы засев; добавление культуральной среды и гомогенизация выполнялись легко и удобно. Перед засевом пометьте крышки чашек соответствующими данными и запустите чашки в двойном экземпляре.

**4.2.6.2** После засева разведений проб, приготовленных в соответствии с В.5.1 Приготовление и разведение проб пищевых продуктов для микробиологического анализа, в чашки Петри добавляют от 12 до 15 мл приготовленной среды, перемешивают ее 6 движениями справа налево, 6 - по часовой стрелке, 6 - против часовой стрелки и 6 - назад вперед, на гладкой и горизонтальной поверхности до тех пор, пока не будет достигнуто полное включение посевного материала в среду; следите за тем, чтобы среда не намочила крышку чашек. Дайте затвердеть.

**4.2.6.3** Включите чашку без засева для каждой партии среды и разбавителя, подготовленного для контроля стерильности.

**4.2.6.4** Время, прошедшее с момента включения пробы в разбавитель, до тех пор, пока культуральная среда, наконец, не будет добавлена в чашки, не должно превышать 20 минут.

**4.2.6.5** Инкубируйте чашки в перевернутом положении (с опущенной крышкой) в течение необходимого времени и при необходимой температуре, в зависимости от типа пищевого продукта и задействованных микроорганизмов, см. Таблицу 1.

**ТАБЛИЦА 1**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Бактериальная группа** | **Температура** | **Время инкубации** |
| Аэробные термофильные | 55 ± 2ºC | 48 ± 2 ч |
| Аэробные мезофильные | 35 ± 2ºC | 48 ± 2 ч |
| Психротрофические | 20 ± 2ºC | 3-5 дней |
| Психрофильные | 5 ± 2ºC | 7-10 дней |

**4.2.6.6** При считывании выберите те чашки, в которых присутствует от 25 до 250 КОЕ, чтобы уменьшить
ошибку в счете.

**4.2.6.7** Подсчитайте все колонии, развившиеся в выбранных чашках (кроме плесени и
дрожжей), включая точечные колонии. Используйте микроскоп для решения тех случаев, когда
 колонии невозможно отличить от мелких частиц пищи.

**4.2.7** Выражение результатов

**4.2.7.1** Расчет метода.

**i)** После инкубации подсчитайте чашки в диапазоне от 25 до 250 колоний, используя счетчик колоний и регистратор. Чашки не менее одного из трех разведений должны находиться в диапазоне от 25 до 250. Если только одно разведение находится в соответствующем диапазоне, см. Таблицу 2, Пример 1. Рассчитайте среднее количество на грамм или миллилитр указанного разведения и составьте отчет.

**ii)** Когда два разведения находятся в соответствующем диапазоне, определите среднее количество для каждого разведения, прежде чем усреднить количество двух разведений, чтобы получить количество в чашке на грамм или миллилитр, см. Таблицу 2, Пример 2.

**iii)** В целях стандартизации критериев отчетности по подсчету в тестах, где в чашках представлены ситуации, не предусмотренные в предыдущих примерах, представлены следующие рекомендации:

**iv)** Чашки с менее чем 25 колониями. - Когда чашки с самым низким разведением показывают количество колоний менее 25, подсчитайте количество колоний, присутствующих в указанном разведении, усредните количество колоний и умножьте на коэффициент разведения, чтобы получить ориентировочное значение подсчета в чашке. Проясните эту ситуацию в своем отчете, добавив надпись «ориентировочное значение», см. Таблицу 2, пример 3.

**v)** Чашки с более чем 250 колониями. - Когда количество колоний в чашке превышает 250, подсчитывают колонии в тех частях чашки, которые представляют распределение колоний. Посчитайте, например, четверть или половину площади чашки и умножьте полученное значение на 4 или 2 соответственно. Если можно сосчитать только несколько квадратов, считайте, что на дне чашки Петри диаметром 100 мм находится 65 квадратов счетной сетки. Проясните эту ситуацию в своем отчете, добавив надпись «ориентировочное значение», см. Таблицу 2, пример 4.

**vi)** Расширенные колонии. - Расширенные колонии могут иметь следующие формы:

**vii)** Ряды колоний, четко не отделенных друг от друга, что, по-видимому, вызвано распадом скопления бактерий.

**viii)** Колонии, которые развиваются на пленке между агаром и дном чашки.

**ix)** Колонии, которые развиваются в пленке на краю чашки над поверхностью агара.

**x)** Колонии с широко распространенным ростом, иногда сопровождающимся ингибированием роста, которые в совокупности превышают 50% от площади чашки, или, при подавлении роста, превышают 25% от площади чашки.

**xi)** Если необходимо произвести подсчет в чашках, содержащих расширенные колонии, которые не включены в подпункт x) пункта 4.2.7.1, считайте любой из типов vii), viii) или ix) пункта 4.2.7.1 как поступающий из одного источника. В случае колоний типа vii) пункта 4.2.7.1, если чашка содержит одну цепь, считайте ее как одну колонию, если чашка содержит несколько цепей, которые, очевидно, происходят из разных источников, считайте каждую цепь как отдельную колонию. Не считайте каждую колонию в цепи по отдельности. Колонии типа vii) и ix) пункта 4.2.7.1 обычно наблюдаются как рост, отличающийся от других колоний, и учитываются как таковые. Рост типа x) пункта 4.2.7.1 указывайте как расширенный рост. В случае, если одно разведение находится в пределах диапазона, а в другом разведении присутствуют колонии расширенного роста, укажите разведение, в котором колонии могут быть подсчитаны, см. Таблицу 2, Пример 5.

**xii)** Чашки без колоний.- Когда чашки всех разведений не показывают колоний, укажите количество в чашке как в два раза меньшее самого низкого значения используемого разведения, см. Таблицу 2, Пример 6.

**xiii)** Когда чашки запущены в двух экземплярах и в одной из них представлен рост в пределах соответствующего диапазона, а в другой имеется более чем 250 колоний. - Когда одна чашка содержит от 25 до 250 колоний, а ее дубликат более 250 колоний, подсчитайте обе чашки, включая ту, которая превысила диапазон, чтобы определить количество в чашке см. Таблицу 2, Пример 7.

**xiv)** Когда чашки запущены в двух экземплярах, по одной чашке для каждого разведения в диапазоне от 25 до 250 колоний. - Если в чашках разных разведений содержится количество колоний в пределах диапазона, подсчитайте количество колоний четырех чашек для расчета количества в чашке, см. Таблицу

2, Пример 8.

**xv)** Чашки запускают в двух экземплярах, две с разведением в диапазоне от 25 до 250 и только одну для другого разведения в пределах этого диапазона. Подсчитайте четыре чашки, включая ту, в которой меньше 25 или более 250 колоний, чтобы рассчитать количество в чашках, см. Таблицу 2, Пример 9.

**xvi)** После подсчета колоний на выбранных чашках умножьте на обратное значение разведения, чтобы получить количество КОЕ на миллилитр или грамм пробы. Округлите полученную цифру так, чтобы в начале этой цифры отображались только две значащие цифры. Чтобы округлить, увеличьте вторую цифру до следующего большего числа, когда третья цифра справа равна пяти или больше (например: 128 округляется до 130). Если третья цифра четыре или меньше, замените третью цифру нулем, а вторую цифру оставьте без изменений (например: 2417 округляется до 2400):

**4.2.8** Отчет по тестированию

Указывается как: Колониеобразующие единицы, \_\_\_ КОЕ/г или мл, аэробных бактерий, высеянных на триптонный
 агар с дрожжевым экстрактом или агар для стандартного подсчета, инкубированных часов при ºC.

**ТАБЛИЦА 2**

Расчет значений подсчета в чашке
(анализы в двух экземплярах)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Пример** | **Подсчитанные колонии** | **КОЕ / г или мл** |
| число | 1:100 | 1:1,000 | 1:10,000 |  |
| 1 | >250 | 178 | 16 | 180,000 |
|  | >250 | 190 | 17 |  |
| 2 | >250 | 220 | 25 | 250,000 |
| 3 | 18 | 2 | 0 | 1,600 |
|  | 14 | 0 | 0 |  |
| 4 | >250 | >250 | 512 | 5,000,000 |
|  | >250 | >250 | 495 |  |
| 5 | >250 | 235 | Расширенный рост |  |
| 6 | 0 | 0 | 0 | <100 |
| 7 | >250 | 240 | 24 | 250,000 |
|  | >250 | 268 | 19 |  |
| 8 | >250 | 216 | 23 | 280,000 |
|  | >250 | 262 | 42 |  |
| 9 | >250 | 215 | 20 | 23,000 |
|  | >250 | 235 | 26 |  |
|  | >250 | 275 | 32 | 270,000 |
|  | >250 | 225 | 26 |  |

**4.3** Метод подсчета общего количества колиформных микроорганизмов в чашке.

**4.3.1** Введение

Группа колиформных микроорганизмов наиболее широко используется в пищевой микробиологии в качестве показателя неправильной гигиенической практики.

Колиформные бактерии в качестве санитарного показателя могут применяться для:

Выявления плохой санитарной практики в обращении и производстве продуктов питания.

Оценки микробиологического качества продукта, хотя его наличие не обязательно связано с риском для здоровья.

Оценки эффективности санитарно-гигиенического использования оборудования.

Санитарного качества воды и льда, используемых в различных областях пищевой промышленности.

Выявление и подсчет колиформных микроорганизмов могут производиться с использованием жидких или твердых культуральных сред с селективными или дифференциальными характеристиками.

**4.3.2** Основные принципы

Этот метод позволяет определить количество колиформных микроорганизмов, присутствующих в пробе, с использованием селективной среды (красно-фиолетовый желчный агар), в которой бактерии развиваются при 35°C примерно 24 часа, что приводит к образованию газа и органических кислот, которые меняют показатель рН и осаждают соли желчи.

**4.3.3** Реагенты и материалы

**4.3.3.1** Реагенты

Указанные ниже реагенты должны быть аналитической чистоты, и когда указывается вода, ее следует понимать как дистиллированную воду.

**i)**  Растворы разбавителей

Фосфатный регуляторный раствор (концентрированный раствор).

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Монокалийфосфат | 34,0 г |
| Вода | 1,0 л |

Приготовление:

Разведите фосфат в 500 мл воды и отрегулируйте рН до 7,2 раствором гидроксида натрия 1,0 N.

Доведите водой до литра.

Стерилизуйте при 121° ± 1,0°C в течение 15 минут. Держите в холодильнике (концентрированный раствор).

Возьмите 1,25 мл концентрированного раствора и доведите водой до одного литра (рабочий раствор).

Распределите порциями по 99,90 и 9 мл по мере необходимости.

Стерилизуйте в течение 15 минут при 121° ± 1,0°C.

После стерилизации рН и конечные объемы рабочего раствора должны быть равны начальным.

**ii)** Пептонированная вода

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Пептон | 1,0 |
| NaCl | 8,5 г |
| Вода | 1,0 л |

Приготовление:

Разведите компоненты в литре воды.

Отрегулируйте рН до 7 с помощью гидроксида натрия 1,0 N.

Распределите порциями по 99,90 и 9 мл или в любом объеме, кратным девяти по мере необходимости.

Стерилизуйте в течение 15 минут при 121° ± 1,0°C.

После стерилизации рН и конечные объемы рабочего раствора должны быть равны начальным.

Если этот разбавитель не используется сразу, храните его в темном месте при температуре от 0 до 5°C не дольше месяца в условиях, при которых не изменяется его объем или состав.

**iii)** Культуральная среда.

Красно-фиолетовый-желчно-лактозный агар (RVBA)

**Формула**

|  |  |
| --- | --- |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Пептон | 7,0 г |
| Дрожжевой экстракт | 3,0 г |
| Лактоза | 10,0 г |
| Желчные соли | 1,5 г |
| Хлорид натрия | 5,0 г |
| Нейтральный красный | 0,03 г |
| Кристальный фиолетовый | 0,002 г |
| Агар | 15,0 г |
| вода | 1,0 л |

Приготовление:

Смешайте компоненты в воде и оставьте на несколько минут.

Идеально смешайте и отрегулируйте рН до 7,4 соляной кислотой 0,1 N или гидроксидом натрия 0,1 N при 25°С, чтобы после нагрева он оставался в этом значении.

Нагрейте при постоянном помешивании и кипятите в течение 2 минут.

Немедленно охладите среду на водяной бане, пока она не достигнет 45°C.

Избегайте перегрева среды.

Она не должна стерилизоваться в автоклаве.

Используйте среду в течение первых трех часов после ее приготовления.

В случае использования обезвоженной культуральной среды следуйте инструкциям производителя.

**4.3.3.2** Материалы

Бактериологические пипетки для распределения по 10 и 1 мл (или при необходимости по 1 мл и 2 мл), с ватным тампоном.

Пипетки могут быть градуированы в объемах, равных одной десятой от их общего объема.

Флаконы из желтого стекла объемом 250 мл с завинчивающейся крышкой.

Пробирки 16 x 150 мм с завинчивающейся крышкой.

Стерилизуемая посуда для отбора проб: ножи, пинцет, ножницы, ложки, шпатели и т. д.

Чашки Петри.

Все материалы и инструменты, контактирующие с исследуемыми пробами, должны быть простерилизованы в:

Печи в течение 2 ч при 170 - 175°C или 1 ч при 180°C, или в автоклаве в течение 15 минут при не менее 121 ± 1,0°C.

Стеклянный материал может быть заменен одноразовым материалом, который соответствует желаемым требованиям. Стеклянную посуду, поврежденную в результате многократной стерилизации, использовать нельзя, она должна быть химически инертной.

**4.3.4** Приборы и инструменты

Печь для стерилизации, достигающая минимальной температуры 170°C.

Автоклав с термометром и манометром, откалиброванный с помощью термометра до минимума и максимума.

Водяная баня с контролем температуры и механической циркуляцией, снабженная калиброванным термометром с делениями 0,1°C и поддерживающая температуру 45 ± 1,0°C.

Одно-или двухскоростной блендер, управляемый реостатом или перистальтическим гомогенизатором (стомахером).

Стерилизуемые стаканы для блендера с крышкой или стерильные пакеты для перистальтического гомогенизатора.

Инкубатор с термостатом, чтобы избежать отклонений выше ± 1,0 ºC, снабженный калиброванным термометром.

Счетчик колоний в темном поле с достаточным освещением, клетчатой ​​стеклянной чашкой и увеличительной линзой.

Механический или электронный регистратор.

Оптический микроскоп.

Потенциометр с минимальной шкалой 0,1 единицы рН при 25 °C.

**4.3.5** Подготовка пробы

Подготовка пробы должна производиться в соответствии с положениями 4.1 Подготовка и разведение проб пищевых продуктов для микробиологического анализа.

**4.3.6** Процедура

**4.3.6.1** Поместите 1 мл жидкой пробы прямого разведения или первичного разведения в чашки Петри в двух экземплярах, используя для этого стерильную пипетку.

**4.3.6.2** Повторите процедуру столько раз, сколько десятичных разведений требуется посеять, используя другую стерильную пипетку для каждого разведения.

**4.3.6.3** Залейте 15-20 мл растопленной среды RVBA и выдержите при температуре 45 ± 1,0°C на водяной бане. В случае использования пластиковых чашек Петри наливают от 10 до 15 мл среды. Время, прошедшее между приготовлением первичного разведения и временем заливки культуральной среды, не должно превышать 20 минут.

**4.3.6.4** Тщательно перемешайте посевной материал со средой шестью движениями справа налево, шестью движениями по часовой стрелке, шестью движениями против часовой стрелки и шестью движениями назад вперед на гладкой поверхности и выровняйте. Дайте смеси затвердеть, поместив чашки Петри на холодную горизонтальную поверхность.

**4.3.6.5** Подготовьте контрольную чашку с 15 мл среды для проверки стерильности.

**4.3.6.6** После того, как среда полностью затвердеет в чашке, вылейте около 4 мл среды RVBA при 45 ± 1,0°C на поверхность засеянной среды. Дайте затвердеть.

**4.3.6.7** Переверните чашки и поместите их в инкубатор при 35°C на 24 ± 2 часа.

**4.3.6.8** По истечении периода, указанного для инкубации, подсчитайте колонии счетчиком колоний.

**4.3.6.9** Выберите чашки, содержащие от 15 до 150 колоний. Типичные колонии темно-красные, обычно окружены ореолом осадков светло-красного или розового цвета из-за желчных солей, колониальная морфология похожа на двояковыпуклые линзы диаметром от 0,5 до 2,0 мм.

**4.3.7 Выражение результатов
 4.3.7.1** Расчет метода

**i)** Чашки, содержащие от 15 до 150 характерных колоний.

Распределите чашки, содержащие вышеупомянутое количество характерных колоний, на два последовательных разведения. Подсчитайте присутствующие колонии. Вычислите количество кишечной палочки на миллилитр или на грамм продукта, умножив количество колоний на обратное значение соответствующего разведения согласно пункта 4.2. Метод подсчета аэробных бактерий в чашке.

**ii)** Чашки, содержащие менее 15 характерных колоний.

Если каждая из чашек имеет менее 15 характерных колоний, укажите полученное число с последующим соответствующим разведением.

**iii)** Чашки с нехарактерными бактериями.

Если в чашках нет характерных колоний, укажите результат как: менее одной колиформы на 1/d на грамм, Где d является фактором разведения.

**4.3.8** Отчет по тестированию

Укажите: КОЕ / г или мл в чашке с красно-фиолетовым желчным агаром, инкубированным при 35°C в течение 24 ± 2 часов.

Если вы используете разведения и не наблюдаете роста, укажите, используя в качестве эталона наименьшее используемое разведение, например разведение 10-1.

В случае отсутствия роста в неразбавленной пробе укажите: "no desarrollo de coliformes por ml" (нет развития кишечной палочки на мл).

**4.4** Метод определения *сальмонеллы* в пищевых продуктах.

**4.4.1** Введение

Представители рода *Salmonella* широко изучаются как патогенные микроорганизмы, когда они присутствуют в пищевых продуктах. Контроль этого микроорганизма, как со стороны органов здравоохранения, так и на фабриках по производству пищевых продуктов, в некоторой степени зависит от аналитического метода, используемого для его обнаружения.

Этот микроорганизм был первоначально идентифицирован в клинических образцах, и методы, используемые для таких случаев, были впоследствии адаптированы для обнаружения в пищевых продуктах. Изменения в методах учитывали два основных аспекта: во-первых, это ослабление или повреждение бактериальных клеток, присутствующих в пищевом продукте, из-за процесса, которому он подвергается (например, термическая обработка, сушка и т.д.), и, во-вторых, изменчивость, присущая природе исследуемого продукта. Для различных пищевых продуктов существуют различные протоколы выделения *сальмонеллы*, все они по существу сходны в принципе и используют стадии предварительного обогащения, селективного обогащения, выделения в селективных и дифференциальных культуральных средах, биохимической идентификации и серологического подтверждения микроорганизмов.

**4.4.2** Основные принципы

Настоящий метод обнаружения *сальмонеллы* в пищевых продуктах описывает общую схему, состоящую из 5 основных этапов:

**4.4.2.1** Предварительное обогащение - это этап, когда проба обогащается неселективной питательной средой, которая позволяет восстановить поврежденные клетки *сальмонеллы* до стабильного физиологического состояния.

**4.4.2.2** Селективное обогащение используется для увеличения популяций *сальмонеллы* и ингибирования других организмов, присутствующих в пробе.

**4.4.2.3** Выделение в твердых средах - на этом этапе используются селективные среды, которые ограничивают рост других видов, отличных от *сальмонеллы*, и позволяют визуально распознавать подозрительные колонии.

**4.4.2.4** Биохимическая идентификация - это шаг, позволяющий генетически идентифицировать культуры *сальмонеллы* и удалять ложные подозрительные культуры.

**4.4.2.5** Серотипирование является серологическим методом, который позволяет идентифицировать конкретную культуру.

**4.4.3** Реагенты и материалы

В случае наличия обезвоженных коммерческих формул следует соблюдать инструкции, напечатанные на соответствующей этикетке для их приготовления.

Химикаты используемые для подготовки культуральных сред и реагентов должны быть аналитической чистоты.

**4.4.3.1** Реагенты

**i)** Средства предварительного обогащения

Буферная пептонная вода

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Пептон | 10,0 г |
| Хлорид натрия | 5,0 г |
| Двухосновный фосфат натрия | 3,5 г |
| Одноосновный фосфат калия | 1,5 г |
| Вода | 1,0 л |

Приготовление

Разведите компоненты в воде, нагревая при необходимости.

Отрегулируйте рН, если необходимо, после стерилизации до 7,0.

Распределите по стерилизуемым стеклянным контейнерам емкостью, необходимой для получения нужных порций для проведения теста.

Стерилизуйте в течение 20 мин при 121 ± 1ºC.

Лактозный бульон

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Экстракт мяса | 3,0 г |
| Пептон | 5,0 г |
| Лактоза | 5,0 г |
| Дистиллированная вода | 1,0 г |
| конечный pH 6,9 + 0,2 |

Приготовление

Разведите ингредиенты в воде, нагревая до 65ºC.

Распределите порциями по 225 мл в банки объемом 500 мл.

Стерилизуйте в течение 15 мин при 121ºc ± 1ºC.

**ii)** Обогащающий бульон

Селенитно-цистиновый бульон

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Тристон или полипептон | 5,0 г |
| Лактоза | 4,0 г |
| Динатрийфосфат | 10,0 г |
| Кислый селенит натрия | 4,0 г |
| L-цистин | 0,01 г |
| Дистиллированная вода | 1,0 л |
| конечный рН 7,0 + 2 при 25°C |  |

Приготовление

Разведите ингредиенты в литре стерильной дистиллированной воды и распределите в объемах 10 и 225 мл по стерильным контейнерам по мере необходимости.

Приготовленный таким образом бульон должен быть прозрачным. Желательно использовать его в тот же день его приготовления.

Если вы хотите сохранить среду в течение нескольких дней, она может подвергаться воздействию тепла в автоклаве в течение 5 мин при 110ºC ± 1ºC, затем принимая лососевый цвет.

Тетратионатный бульон

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Белковый пептон или триптон | 5,0 г |
| Желчные соли | 1,0 г |
| Карбонат кальция | 10,0 г |
| Пентагидрат тиосульфата натрия | 30,0 |
| Дистиллированная вода | 1,0 л |
| конечный pH 7,0 + 0,1 |

Приготовление

Разведите компоненты в литре стерилизованной дестиллированной воды.

Распределите, постоянно перемешивая, порциями по 10 и 225 мл в стерильные контейнеры. Храните в холодильнике.

Перед использованием среды добавьте 2 мл раствора йода-йодида и 1 мл 0,1%-ного раствора ярко-зеленого на 100 мл бульона. Среда после добавления йода не должна нагреваться и должна использоваться в тот же день ее приготовления.

Василиадис-Раппапорт

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Раствор А** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Тристон | 5,0 г |
| Хлорид натрия | 8,0 г |
| Гидрогенизированный фосфат калия | 1,6 г |
| Дистиллированная вода | 1,0 л |

Разведите компоненты в воде при нагревании около 70ºC.

|  |
| --- |
| **Раствор В** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Гексагидрат хлорида магния | 400 г |
| Дистиллированная вода | 1,0 л |

Разведите хлорид магния в воде.

Поскольку эта соль очень гигроскопична, желательно растворить все содержание хлорида магния из недавно открытого контейнера таким образом, чтобы концентрация раствора составляла 0,4 г/мл.

Храните во флаконе из желтого стекла при комнатной температуре.

|  |
| --- |
| **Раствор С** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Малахитовый зеленый оксалат | 0,4 г |
| Дистиллированная вода | 100 мл |

Разведите малахитовый зеленый оксалат в воде.

Храните во флаконе из желтого стекла при комнатной температуре.

|  |
| --- |
| **Полная среда** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Раствор А | 1,000 мл |
| Раствор В | 100 мл |
| Раствор С | 10 мл |

Приготовление

Добавьте 1 000 мл раствора А, 100 мл раствора В и 10 мл раствора С.

При необходимости отрегулируйте рН таким образом, чтобы после стерилизации он составлял 5,2.

Распределите перед использованием по пробиркам в количествах 10 мл.

Храните в холодильнике.

Триптиказо-соевый бульон

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Триптиказа или триптоза | 17,0 г |
| Фитон | 3,0 г |
| Глюкоза | 2,5 г |
| Хлорид натрия | 2,5 г |
| Дистиллированная вода | 1,0 г |
| конечный pH 7,3 + 0,2 |

Приготовление

Разведите ингредиенты в 1 литре дистиллированной воды, медленно нагревая до полного растворения.

Распределите порции по 225 мл в колбы объемом 500 мл и автоклавируйте в течение 15 минут при 121ºc ± 1ºC.

Восстановленное обезжиренное молоко

Разведите 100 г сухого обезжиренного молока в литре дистиллированной воды. Перемешайте по кругу до растворения. Распределите в объемах 225 мл по колбам Эрленмейера емкостью 500 мл. Стерилизуйте при 121ºC ± 1ºC в течение 15 минут. Окончательный объем должен быть откорректирован, чтобы сохранить 225 мл.

Стерильный триптиказо-соевый бульон с добавлением сульфита калия

Добавьте в триптиказо-соевый бульон 5 г сульфита калия на 1000 мл среды, составив конечную концентрацию сульфита калия 0,5%. Добавьте сульфит калия перед стерилизацией в автоклаве обычным способом.

**iii)** Средства изоляции

Ярко-зеленый агар (VB)

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Дрожжевой экстракт | 3,0 г |
| Полипептон (белковый пептон № 3) | 10,0 г |
| Хлорид натрия | 5,0 г |
| Лактоза | 10,0 г |
| Сахароза | 10,0 г |
| Феноловый красный | 0,08 г |
| Агар | 20,0 г |
| Ярко-зеленый | 0,0125 г |
| Дистиллированная вода | 1,0 л |
| конечный pH 6,9 ± 0,2 |

Приготовление

Разведите ингредиенты в литре дистиллированной воды и доведите до кипения до полного растворения. Отрегулируйте рН.

Стерилизуйте в автоклаве в течение 15 мин при 121ºC ± 1ºC. Перегрев среды снижает ее селективность.

Охладите среду до 50ºC и распределите ее по стерильным чашкам Петри. Внешний вид среды темный, коричневый.

Агар с сульфитом висмута

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Экстракт говядины | 5,0 г |
| Смесь пептонов | 10,0 г |
| Глюкоза | 5,0 г |
| Динатрийфосфат (безводный) | 5,0 г |
| Сульфат железа (безводный) | 0,3 г |
| Сульфит висмута | 8,0 г |
| Ярко-зеленый | 0,025 г |
| Агар | 20,0 г |
| Дистиллированная вода | 1,0 л |
| конечный рН | 7,6 + 0,2 |

Приготовление

Разведите компоненты в литре воды. Нагрейте до полного растворения, часто помешивая. Отрегулируйте рН.

Охладите до 45ºC и вылейте в стерильные чашки Петри, равномерно распределив осадок среды.

Внешний вид среды в чашках непрозрачный, бледно-зеленый, среда должна использоваться в тот же день приготовления. Если цвет коричневый, среду нельзя использовать.

Среда не должна стерилизоваться в автоклаве; перегрев влияет на ее селективность.

Ксилозолизин-дезоксихолатный агар (XLD)

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Ксилоза | 3,75 г |
| L-лизин | 5,0 г |
| лактоза | 7,5 г |
| Сахароза | 7,5 г |
| Хлорид натрия | 5,0 г |
| Дрожжевой экстракт | 3,0 г |
| Феноловый красный | 0,08 г |
| Агар | 15,0 г |
| Дезоксоколат натрия | 2,5 г |
| Цитрат аммония железа | 0,8 г |
| Тиосульфат натрия | 6,8 г |
| Дистиллированная вода | 1,0 л |
| конечный рН | 6,9 + 0,2 |

Приготовление

Разведите ингредиенты в литре дистиллированной воды и нагрейте на водяной бане до 55ºC, часто помешивая, до полного растворения. Отрегулируйте рН.

Охладите среду до 50ºC и распределите ее по стерильным чашкам Петри. Не стерилизуйте.

При перегреве выпадают осадки; реакционная способность среды может быть удовлетворительной, но колонии обычно очень маленькие.

Внешний вид среды светлый и ярко-красный.

Агар для *сальмонеллы* и *шигеллы* (SS)

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Экстракт мяса | 5,0 г |
| Полипептон | 5,0 г |
| Лактоза | 10,0 г |
| Желчные соли | 8,5 г |
| Дигидрат цитрата натрия | 8,5 г |
| Пентагидрат тиосульфата натрия | 8,5 г |
| Цитрат железа | 1,0 г |
| Агар | 13,5 г |
| Нейтральный красный | 0,025 г |
| Ярко-зеленый | 0,33 мг |
| Дистиллированная вода | 1,0 л |
| конечный pH 7,0 + 0,2 |

Приготовление

Разведите ингредиенты в литре стерильной дистиллированной воды и доведите до кипения до полного растворения. Отрегулируйте рН. Не стерилизуйте в автоклаве.

Охладите до 50ºC и распределите по стерильным чашкам Петри в асептических условиях.

Внешний вид растопленной среды чистый и имеет розовый цвет.

Энтеросолюбильный агар Гектоен

**Формула**

|  |  |
| --- | --- |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Белковый пептон | 12,0 г |
| Дрожжевой экстракт | 3,0 г |
| Лактоза | 12,0 г |
| Сахароза | 12,0 г |
| Салициллин | 2,0 г |
| Желчные соли | 9,0 г |
| Хлорид натрия | 5,0 г |
| Тиосульфат натрия | 5,0 г |
| Цитрат аммония железа | 1,5 г |
| Бромотимоловый синий | 0,064 г |
| Fascina ácida (Кислотное очарование) | 0,1 г |
| Агар | 13,5 г |
| Вода | 1,0 л |
| конечный рН | 7,5 + 0,2 |

Приготовление

Разведите ингредиенты в дистиллированной воде, кипятите при помешивании до полного растворения агара.

Не перегревайте.

Охладите до 55-60ºC и распределите по стерильным чашкам Петри в асептических условиях.

**iv)** Средства для биохимических тестов

Агар с тремя сахарами и железом (TSI)

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Мясной пептон | 1,0 г |
| Казеиновый пептон | 1,0 г |
| Хлорид натрия | 0,5 г |
| Лактоза | 1,0 г |
| Сахароза | 1,0 г |
| Глюкоза | 0,1 г |
| Агар | 1,3 г |
| Феноловый красный | 2,5 мг |
| Пентагидрат сульфата аммония железа | 20,0 мг |
| Тиосульфат натрия | 20,0 мг |
| Дистиллированная вода | 100 мл |
| конечный pH 7,3 + 0,2 |

Приготовление

Разведите ингредиенты в 100 мл дистиллированной воды. Доведите до кипения, периодически помешивая, до полного растворения.

Охладите до 60ºC и отрегулируйте pH.

Распределите в объемах 3 мл в пробирках емкостью 13 x 100 мм и стерилизуйте при 121ºC ± 1ºC в течение 15 минут.

Наклоните пробирки так, чтобы культуральная среда на дне достигала высоты 3 см и глубины 4 см. Среда должна быть красного цвета.

Агар железа и лизина (LIA)

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Пептон желатина | 0,5 г |
| Дрожжевой экстракт | 0,3 г |
| Глюкоза | 0,1 г |
| L-лизин | 1,0 г |
| Цитрат аммония железа | 50 мг |
| Безводный тиосульфат натрия | 4,0 мг |
| Бромкрезоловый пурпурный | 2,0 мг |
| Агар | 1,5 г |
| Дистиллированная вода | 100 мл |
| конечный рН | 6,7 + 0,2 |

Приготовление

Разведите ингредиенты в дистиллированной воде и хорошо перемешайте, нагрейте до кипения при частом помешивании до полного растворения. Отрегулируйте рН.

Распределите в объемах 3 мл в пробирки размером 13 x 100 мм с завинчивающейся крышкой.

Стерилизуйте в автоклаве при температуре 121ºC ± 1ºC в течение 12 минут. Дайте пробиркам остыть в наклонном положении, чтобы получить среднюю высоту 4 см и наклонную поверхность 2 см.

Готовая среда должна быть пурпурного цвета.

Питательный агар

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Экстракт мяса | 3,0 г |
| Пептон | 5,0 г |
| Агар | 15,0 г |
| Дистиллированная вода | 1,0 л |
| конечный рН | 6,8 + 0,2 |

Приготовление

Разведите ингредиенты в воде. Дайте постоять 5-10 мин.

Доведите до кипения до полного растворения. Распределите по пробиркам размером 13 х 100 мм в количестве 1/3 их объема.

Стерилизуйте при 121ºC ± 1ºC в течение 15 минут. Наклоните пробирки, прежде чем агар затвердеет.

Среда SIM (сульфида, индола и подвижности)

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Экстракт мяса | 3,0 г |
| Пептон | 30,0 г |
| Пептонизированное железо | 0,20 г |
| Тиосульфат натрия | 0,025 г |
| Дистиллированная вода | 1,0 л |
| конечный рН | 7,3 + 0,2 |

Приготовление

Разведите ингредиенты в дистиллированной воде, доведите до кипения, часто помешивая до полного растворения.

Охладите до 50ºC и отрегулируйте pH.

Распределите в объемах 3 мл по пробиркам емкостью 13 x 100 мм и стерилизуйте в автоклаве при 121ºC ± 1ºC в течение 15 минут. Оставьте остывать пробирки в вертикальном положении.

Цитратный агар Симмонса

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Фосфат аммония | 1,0 г |
| Дикалийфосфат | 1,0 г |
| Хлорид натрия | 5,0 г |
| Цитрат натрия | 2,0 г |
| Сульфат магния | 0,20 г |
| Бромотимоловый синий | 0,08 г |
| Агар | 15,0 г |
| Дистиллированная вода | 1,0 л |
| конечный рН | 6,8 + 0,2 |

Приготовление

Разведите ингредиенты в дистиллированной воде, доведите до кипения, часто помешивая до полного растворения.

Отрегулируйте рН.

Распределите в объемах 3 мл по пробиркам емкостью 13 x 100 мм и стерилизуйте в автоклаве при 121ºC ± 1ºC в течение 15 минут.

Дайте пробиркам остыть в наклонном положении.

Бульон MR-VP (метиловый красный Фогес-Проскауэр)

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **ингредиенты** | **Количества** |
| Пептон | 7,0 г |
| Декстроза | 5,0 г |
| Дифосфат калия | 5,0 г |
| Дистиллированная вода | 1,0 л |
| конечный рН | 6,9 + 0,2 |

Приготовление

Разведите ингредиенты в дистиллированной воде, доведите до кипения, часто помешивая до полного растворения.

Отрегулируйте рН.

Распределите в объемах 3 мл по пробиркам емкостью 13 x 100 мм и стерилизуйте в автоклаве при 121ºC ± 1ºC в течение 15 минут.

Маннитный бульон

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Экстракт мяса | 1,0 г |
| Белковый пептон | 10,0 г |
| Хлорид натрия | 5,0 г |
| Феноловый красный | 0,018 г |
| Маннит | 10,0 г |
| Вода | 1,0 л |
| конечный рН | 7,4 + 0,2 |

Приготовление

Разведите 26 г обезвоженной среды в литре воды, перемешайте и отрегулируйте рН.

Распределите в объемах от 2 до 3 мл по пробиркам размером 13 х 100 мм.

Стерилизуйте при 121ºC ± 1ºC в течение 15 минут.

Малонатный бульон

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Дрожжевой экстракт | 1,0 г |
| Сульфат аммония | 2,0 г |
| Дикалийфосфат | 0,6 г |
| Монокалийфосфат | 0,6 г |
| Хлорид натрия | 2,0 г |
| Малонат | 3,0 г |
| Глюкоза | 0,250 г |
| Бромотимоловый синий | 0,025 г |
| Вода | 1,0 л |
| конечный рН | 6,7 + 0,2 |

Приготовление

Разведите ингредиенты в воде, перемешайте и отрегулируйте рН. Распределите по пробиркам размером 13 х 100 мм в количестве 3 мл. Стерилизуйте в автоклаве при температуре 121ºC ± 1ºC в течение 15 минут.

Бульон мочевины

**Формула**

|  |  |
| --- | --- |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Мочевина | 20,0 г |
| Дрожжевой экстракт | 0,1 г |
| Монокалийфосфат | 9,10 г |
| Дикалийфосфат | 9,5 г |
| Феноловый красный | 0,01 г |
| Вода | 1,0 л |
| конечный рН | 6,8 + 0,2 |

Приготовление

Разведите ингредиенты в дистиллированной воде.

НЕ НАГРЕВАТЬ. Стерилизуйте фильтрацией через мембрану 0,45 мкм или в автоклаве при 5-8 фунтах давления в течение 15 минут.

Соблюдая правила асептики, распределите от 1,5 до 3 мл по стерильным пробиркам размером 13 x 100 мм.

Быстрый бульон мочевины

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Мочевина | 20,0 г |
| Дрожжевой экстракт | 0,10 г |
| Монокалийфосфат | 0,091 г |
| Дикалийфосфат | 0,095 г |
| Феноловый красный | 0,010 г |
| Вода | 1,0 л |
| конечный рН | 6,8 + 0,2 |

Приготовление

Разведите ингредиенты в дистиллированной воде.

НЕ НАГРЕВАТЬ. Стерилизуйте фильтрацией через мембрану 0,45 мкм. Соблюдая правила асептики, распределите от 1,5 до 3 мл по стерильным пробиркам размером 13 x 100 мм.

Бульон настоя из мозгов и сердца

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Настой из мозгов и сердца | 200,0 г |
| Настой из говяжьего сердца | 250,0 г |
| Белковый пептон | 10,0 г |
| Хлорид натрия | 5,0 г |
| Динатрийфосфат додекагидрат | 2,5 г |
| Декстроза | 2,0 г |
| Дистиллированная вода | 1,0 л |
| конечный рН | 7,4 ± 0,2 |

Приготовление

Разведите ингредиенты в дистиллированной воде, осторожно нагрейте.

Распределите и стерилизуйте при 121ºC ± 1ºC в течение 15 минут. **v)** Растворы

0,1% ярко-зеленый раствор (1: 1000)

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Ярко-зеленый | 0,1 г |
| Стерильная дистиллированная вода | 100,0 мл |

Разведите 0,1 г ярко-зеленого в стерильной дистиллированной воде до 100 мл.

Раствор йода-йодида

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Кристаллы йода | 6,0 г |
| Йодид калия | 6,0 г |
| Дистиллированная вода | 100,0 мл |

Растворите кристаллы и йодид калия в дистиллированной воде до 100 мл. Храните во флаконе из желтого стекла.

Физиологический раствор 0,85%

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Хлорид натрия | 0,85 г |
| Дистиллированная вода | 100,0 мл |

Разведите хлорид натрия в воде и стерилизуйте при 121°C ± 1 ° C в течение 15 минут.

Формализованный физиологический раствор

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Раствор формальдегида (36-38 %) | 6,0 мл |
| Хлорид натрия | 8,5 г |
| Дистиллированная вода | 1,0 л |

Разведите 8,5 г хлорида натрия в 1 литре дистиллированной воды. Стерилизуйте при 121ºC ± 1ºC в течение 15 минут.

Охладите до комнатной температуры. Добавьте 6 мл раствора формальдегида. Не стерилизуйте после добавления формальдегида.

Реагент Ковача

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| п-диметил-аминобензальдегид | 5,0 г |
| Амиловый спирт | 75,0 мл |
| Концентрированная соляная кислота | 25,0 мл |

Разведите п-диметил-аминобензальдегид в амиловом спирте, а затем медленно добавьте соляную кислоту. Храните во флаконе из желтого стекла в холодильнике.

Раствор Альфа-нафтола 5%

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Альфа-нафтол | 5,0 г |
| Спирт | 100,0 мл |

Разведите 5 г альфа-нафтола в 100 мл спирта.

Раствор метиловый красный

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Метиловый красный | 0,10 г |
| Этиловый спирт | 300,0 мл |
| Дистиллированная вода с.b.p. | 500,0 мл |

Разведите метиловый красный в этиловом спирте и доведите водой до 500 мл.

40%-ный раствор гидроксида калия%

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Гидроксид калия | 40,0 г |
| Дистиллированная вода | 100,0 мл |

Разведите 40 г гидроксида калия в 100 мл воды.

5%-ный раствор желатиназы

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Желатиназа | 5,0 г |
| Вода | 100,0 мл |

Разведите 5 г желатиназы в 100 мл дистиллированной воды. НЕ НАГРЕВАТЬ.

**vi)** Антисыворотка

Соматическая поливалентная антисыворотка (О)

Жгутиковая поливалентная антисыворотка (H)

Антисыворотка Vi

**4.4.3.2** Материал

Колбы Эрленмейера 500 мл.

Сосуды с широким горлышком соответствующей вместимости для хранения простых и составных проб

Стеклянные уголки

Ложки, скальпели, ножи и щипцы

Пробирки размером 16 x 150 мм и 20 x 100 мм

Серологические пробирки размером 10 x 75 мм или 13 x 100 мм

Бактериологические пипетки 10,0 и 5,0 мл с градацией 0,1 мл и защищенные ватным тампоном

Пипетки 1 мл, с градацией 0,01 мл

Стерильные стеклянные или одноразовые чашки Петри

Решетки для пробирок

Ручка из платины или нихромеля диаметром около 3 мм

Лакмусовая бумага pH (диапазон 6-8) с максимальными градациями 0,4 единицы pH для изменения цвета

Все материалы, контактирующие с исследуемыми пробами, должны быть простерилизованы в:

Печи в течение 2 часов при 170-175ºC, или в автоклаве в течение 15 минут при 121ºC ± 1ºC

**4.4.4** Оборудование

Печь для стерилизации при 180ºC

Инкубатор с термостатом для предотвращения колебаний более ± 0,1°С и термометром

Автоклав с термометром или манометром, протестированный максимальным термометром

Водяная баня с термостатом и термометром

Гранатарные весы с точностью 0,1 г

Одно- или двухскоростной блендер, управляемый реостатом, со стерилизуемыми стаканами (из стекла или алюминия)

Зажигалки Бунзена или Фишера

Потенциометр

**4.4.5** Процедура

**4.4.5.1** Приготовление пищевых продуктов для изоляции *сальмонеллы*

Следующие методы основаны на анализе 25 г аналитической пробы в соотношении 1:9 проба/бульон. Это количество может варьироваться при условии сохранения той же пропорции. Рекомендуется проба 25 г или более.

**i)** Общая процедура подготовки проб

Соблюдая правила асептики, взвесьте 25 г пробы в стерильном стакане блендера или стерильном мешке для обработки в перистальтическом гомогенизаторе (стомахере). Добавьте 225 мл стерильной среды предварительного обогащения (обычно лактозированный бульон, если не указано другое) и при необходимости взбейте в течение одной минуты.

Соблюдая правила асептики, перенесите гомогенизированную смесь в стерильный сосуд с широким горлом с завинчивающейся крышкой и оставьте на 60 минут при комнатной температуре с плотно завинченной крышкой. Хорошо перемешайте и определите приблизительный рН с помощью лакмусовой бумаги рН. При необходимости доведите pH до 6,8 ± 0,2 с помощью стерильного гидроксида натрия 1 N или соляной кислоты 1 N. Перемешайте и закройте сосуд, аккуратно завинтив крышку.

Инкубируйте 24 ± 2 ч при 35ºC. Продолжите как указано в подпункте i) пункта 4.4.5.2

**ii)** Конкретная процедура подготовки пробы в соответствии с продуктом

**iii)** Яичный порошок, порошкообразный яичный белок, порошкообразный яичный желток, пастеризованные и замороженные жидкие яйца, детские смеси и порошкообразные смеси (мука для блинов, печенья, пончиков, бисквитов и хлеба).

Желательно не размораживать пробу. При необходимости приготовьте замороженные пищевые продукты непосредственно перед взятием аналитической пробы, размораживая их при 45ºC в течение около 15 минут при постоянном помешивании на водяной бане или в течение 18 ч при температуре от 2 до 5ºC. Продукты, не содержащие порошка, обрабатываются в соответствии с общей процедурой, указанной в подпункте i) пункта 4.4.5.1. Для порошкообразных продуктов взвесьте 25 г аналитической пробы и поместите в среду предварительного обогащения, дав порошку медленно намокнуть. При необходимости постепенно гомогенизируя стерильной стеклянной палочкой или другим подобным стерильным инструментом. Продолжайте так же, как описано в общей процедуре.

**iv)** Продукты, содержащие яйца в их составе (суповые пасты, китайские рулетики и т.д.), обрабатывайте как указано в подпункте iii) пункта 4.4.5.1 с использованием лактозированного бульона в качестве среды предварительного обогащения, взбивая в течение двух минут. После инкубации продолжайте как указано в подпункте i) пункта 4.4.5.2

**v)** Термически обработанные продукты и сухие продукты. Выполняйте процедуру, указанную в подпункте i) пункта 4.4.5.1, до гомогенизации. Если проба порошкообразная или измельченная, можно не взбивать.

После отстаивания хорошо перемешайте и отрегулируйте pH, как указано в общей процедуре. Чтобы эмульгировать жиры, добавьте моющие средства в тех же пропорциях и с теми же рекомендациями, что и для кокоса. Их количество будет во многом зависеть от состава пищевого продукта. Моющие средства не нужны для порошкообразных железистых продуктов.

Инкубируйте как указано в подпункте i) пункта 4.4.5.2

**4.4.5.2** Изоляция *сальмонеллы*

**i)** Плотно закройте завинчивающуюся крышку колб с культурами предварительного обогащения и осторожно встряхните, поместите соответственно 1 мл смеси в одну пробирку, содержащую 10 мл тетратионатного бульона, и в другую с 10 мл селенитно-цистинового бульона. В качестве альтернативы вместо тетратионатного бульона можно использовать среду Василиадис-Раппапорт.

**ii)** Инкубируйте 18-24 ч при 35ºC или, в случае сильно загрязненных пищевых продуктов, при 42ºC в течение того же времени. Распределите продукты, которые были обогащены напрямую, по селективным средам.

**iii)** Смешайте пробирку с селенитно-цистиновым бульоном и поместите в агар с ксилозолизин-дезоксихолатом (XLD), ярко-зеленый агар (VB) и третью чашку с любой из дополнительных селективных сред (энтеросолюбильный агар Гектоен, агар с сульфитом висмута или SS-агар).

Проделайте такую же процедуру с тетратионатным бульоном. Инкубируйте чашки 24 ± 2 ч при 35ºC.

**iv)** Рассмотрите чашки для исследования наличия типичных колоний *сальмонеллы* в соответствии со следующими характеристиками:

Агар XLD: розовые или красные колонии, которые могут быть прозрачными с черным центром или без него. В некоторых случаях колонии могут казаться полностью черными.

Агар VB: красные или розовые колонии, которые могут быть прозрачными, окруженными красной средой; ферментирующие бактерии лактозы дают желтые колонии.

Энтеросолюбильный агар Гектоен: зеленые или сине-зеленые колонии с черным центром или без него. В некоторых случаях колонии могут казаться полностью черными.

Агар с сульфитом висмута: типичные колонии *сальмонеллы* могут быть коричневыми, серыми или черными; с металлическим блеском или без него. Обычно окружающая среда (ореол) коричневая, позже становится черной.

Некоторые штаммы производят зеленые колонии без образования темного ореола. Если чашки не показывают типичных колоний или роста не наблюдается, инкубируйте дополнительные 24 часа.

Агар SS: полупрозрачные, иногда непрозрачные колонии. Некоторые колонии имеют черный центр. Колонии, ферментирующие лактозу, красные.

**4.4.5.3** Биохимическая идентификация

**i)** Выберите по крайней мере две типичные колонии из каждой селективной среды, которые хорошо изолированы.

Осторожно возьмитесь за центр каждой колонии и засейте две пробирки, одну с агаром с тремя сахарами и железом (TSI), а другую - с агаром железа и лизина (LIA), наклонив поверхности и поместив колонию на дно (проколов агар до дна).

Инкубируйте 24 ± 2 ч при 35ºC.

Храните чашки с селективными средами в холодильнике при температуре от 5 до 8ºC на случай необходимости повторного использования дополнительных колоний.

**ii)** Наблюдайте за ростом в пробирках и рассмотрите колонии, которые дают следующие реакции на *сальмонеллу*, предположительно положительные:

**iii)** Агар TSI: на дне пробирки можно увидеть поворот индикатора из-за ферментации глюкозы; на поверхности среды наблюдается более интенсивный красный цвет, чем у исходной среды, из-за неферментации лактозы или сахарозы. В большинстве случаев наблюдается черная окраска на протяжении всего прокола из-за выработки сероводорода.

**iv)** Агар LIA: усиление пурпурной окраски наблюдается по всей пробирке из-за декарбоксилирования лизина. Считайте отрицательными те культуры, которые явно дают желтый цвет на дне агара. Большинство штаммов *сальмонеллы* продуцируют сероводород в этой среде с чернением на всем протяжении прокола.

**v)** Сохраните все культуры, показывающие характерные реакции *сальмонелл* в средах TSI и LIA, для дополнительных тестов, указанных в подпункте vi) пункта 4.4.5.3.

**vi)** Культуры с TSI, которые не похожи на *сальмонеллу*, но имеют типичные реакции в LIA, должны быть обработаны в качестве предполагаемых положительных культур, поскольку в этих случаях среда LIA позволит обнаружить *S. arizonae* и атипичные штаммы *сальмонеллы* с использованием лактозы или сахарозы. Исключите только те культуры, которые показывают атипичные реакции в обеих средах.

**vii)** Продолжите анализ пробирок с TSI с типичными реакциями. Если культура имеет атипичные реакции в этой среде, возьмите дополнительные колонии из чашек, из которых была получена предыдущая атипичная культура, и снова засейте биохимические тесты.

**viii)** Проведите биохимическую и серологическую идентификацию культур, извлеченных из TSI. Рекомендуется обрабатывать шесть культур на каждые 25 г аналитической единицы путем отбора колоний из обоих средств обогащения.

**ix)** Тест на уреазу

**x)** Тест на уреазу (обычный). Используя стерильную ручку, возьмите предположительно положительный рост культуры из каждой пробирки со средой TSI и засейте пробирки бульоном мочевины. Используйте контрольную среду, чтобы сравнить пурпурный цвет положительных реакций с цветом исходной среды. Инкубируйте 24 ± 2 ч при 35ºC.

**xi)** Тест на уреазу (быстрый). Возьмите два роста предположительно положительной культуры из каждой пробирки со средой TSI и засейте пробирки бульоном мочевины (быстрой). Инкубируйте 2 ч при температуре 37 ± 0,5°С на водяной бане.

Исключите все культуры, которые дают положительную уреазу. Сохраните культуры, которые дают отрицательный тест (без изменения цвета среды).

**4.4.5.4** Серологическая идентификация

**i)** Анализ соматических антигенов *сальмонеллы* (поливалентная антисыворотка О)

**ii)** Нанесите ручкой две отдельные капли стерильного физиологического раствора на предметное стекло или две секции чашки для агглютинации. Разведите в каждой из капель часть культуры, развившейся в TSI.

**iii)** Добавьте к одной из них каплю соматической поливалентной антисыворотки (О) и перемешайте краем ручки или деревянными аппликаторами.

**iv)** Перемешайте, наклоняя вперед и назад примерно в течение одной минуты.

Наблюдайте при хорошем освещении на темном фоне.

**v)** Учитывайте любую степень агглютинации как положительную.

Тест положительный, когда агглютинация присутствует в капле с культурой и антисывороткой и агглютинации нет в капле, содержащей культуру и физиологический раствор.

Если агглютинация наблюдается в обеих каплях, тест не является окончательным, и следует провести дополнительные биохимические тесты.

**vi)** Когда агглютинация положительна с поливалентной сывороткой О, подгруппа может быть определена с использованием антисыворотки для различных подгрупп (группы B, C, D и E, как правило, наиболее распространены).

**vii)** Если агглютинация с антисывороткой О отрицательна, используйте антисыворотку Vi и проведите тест. При наличии агглютинации с Vi, нагрейте культуру до кипения и повторите агглютинацию с поливалентной антисывороткой O.

**viii)** В случае отсутствия группоспецифических сывороток, подайте заявку на типизацию штамма в лабораторию энтеробактерий Национального диагностического и справочного центра Министерства здравоохранения или в Комиссию по аналитическому контролю и расширению охвата (CCAYAC).

**ix)** При необходимости проведите анализ жгутиковых антигенов *сальмонеллы* (поливалентная Антисыворотка H).

**x)** Засейте рост пробирки с TSI в агар настоя мозгов и сердца и инкубируйте в течение 4-6 часов при 35°C до тех пор, пока не будет наблюдаться рост (для анализа в тот же день), или в соевый бульон с триптиказеином и инкубируйте в течение 24 ± 2 при 35°C (для анализа на следующий день). Добавьте 2,5 мл формализованного физиологического раствора к 5 мл культуры в бульоне или к культуре в агаре мозгов и сердца (BHI).

**xi)** Поместите 0,5 мл подготовленной многоцелевой жгутиковой антисыворотки (H) в серологическую пробирку (приблизительно 13 × 100 мм). Добавьте 0,5 мл формализованной культуры. Приготовьте контрольный физиологический раствор, смешав 0,5 мл формализованного раствора с 0,5 мл формализованного антигена. Инкубируйте смеси на водяной бане при температуре 48-50ºC. Наблюдайте с 15-минутными интервалами в течение одного часа. Положительный тест - это когда агглютинация наблюдается в тестовой смеси, но не в контрольной. Тест, в котором ни одна из смесей не проявляет агглютинации, должен интерпретироваться как отрицательный. Когда обе смеси агглютинируют, это считается неспецифическим тестом.

**4.4.5.5** Дополнительные биохимические тесты

Когда первоначальные серологические или биохимические тесты дают нетипичные или неубедительные результаты, выполните тесты, описанные ниже:

**i)** Засейте положительные культуры, полученные из TSI и LIA, в: среду SIM, цитратный агар Симмонса, маннитовый бульон и бульон RM-VP. Используйте малонатный бульон для подтверждения наличия вида *S. arizonae.*

**ii)** Интерпретируйте изменения в засеянных средах в соответствии со следующим:

**iii)** Цитратный агар Симмонса.

Засейте пробирку.

Инкубируйте 96 ± 2 ч при 35 ± 2ºC.

Положительный тест: рост сопровождается изменением цвета с зеленого на синий.

Отрицательный тест: отсутствие роста и отсутствие изменения цвета.

**iv)** Среда SIM

Засейте с проколом до дна.

Инкубируйте 24 ч при 35 ± 2ºC.

Подвижность.

Положительный тест: рост вдоль прокола и в центре культуральной среды.

Отрицательный тест: рост только на протяжении всего прокола.

Выделение сероводорода.

Положительный тест: развитие черного цвета вдоль прокола, который может распространяться на всю среду.

Отрицательный тест: отсутствие черного цвета.

Выделение индола.

Добавьте в пробирку с растущей средой SIM от 0,2 до 0,3 мл реагента Ковача.

Положительный тест: развитие красного кольца.

Отрицательный тест: отсутствие изменения цвета.

**v)** Бульон RM-VP

Засейте пробирку со средой.

Инкубируйте 48 ± 2 ч при 35 ± 2ºC для теста VP и 96 ч для теста RM.

**vi)** тест Фогес-Проскауэра (VP)

Поместите в пробирку один мл культуры на 48 ч.

Добавьте 0,6 мл раствора Альфа-нафтола.

Добавьте 0,2 мл 40%-ного раствора гидроксида калия.

Добавьте несколько кристаллов креатинина (по желанию).

Интерпретируйте результаты после инкубации в течение 2 ч при 35 ± 2°С или в течение 4 ч при комнатной температуре.

Положительный тест: развитие кирпично-красного цвета.

Отрицательный тест: отсутствие изменения цвета.

Повторно инкубируйте оставшуюся часть среды RM-VP еще 48 ч при 35 ± 2ºC.

**viii)** Тест на метиловый красный (RM)

Добавьте в культуральную среду, инкубированную в течение 96 часов, две-три капли раствора метилового красного.

Интерпретируйте результаты немедленно.

Положительный тест: развитие красного цвета.

Отрицательный тест: развитие желтого цвета.

**ix)** Малонатный бульон

Засейте пробирку со средой.

Инкубируйте 40 ± 2 ч при 35 ± 2ºC.

Положительный тест: развитие синего цвета.

Отрицательный тест: отсутствие изменения цвета.

**x)** Маннитный бульон

Засейте пробирку со средой.

Инкубируйте 24 ± 2 ч при 35 ± 2ºC.

Положительный тест: развитие желтого цвета.

Отрицательный тест: отсутствие изменения цвета.

**xi)** Для определения родов исследуемых бактерий см. результаты, полученные в таблице 2.

**Примечание:** проверенные коммерческие биохимические системы могут быть использованы в качестве альтернативы для обычных биохимических тестов.

**4.4.6** Вычисление и выражение результатов

**4.4.6.1** Интерпретация биохимических и серологических реакций.

**ТАБЛИЦА 1**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Биохимические реакции** | **Серологические реакции** | **Интерпретация** |
| Типичная | Антиген O, Vi или H положительный | Штаммы, рассматриваемые как *сальмонелла* |
| Типичная | Все реакции отрицательные |  |
| Типичная | Не доказано | Это может быть *сальмонелла* |
| Атипичные реакции | Антиген O, Vi или H положительный |  |
| Атипичные реакции | Все реакции отрицательные | Не может считаться *сальмонеллой* |

**Примечание: см. Рисунок 1**

**ТАБЛИЦА 2**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Тест или субстрат** | **Положительный** | **Отрицательный ответ** | **Реакция** |
| Глюкоза (TSI) | Желтый | Красный | + |
| Лизин-декарбоксилаза (LIA) | Пурпурный | Желтый | + |
| H2S (TSI и LIA) | Черный | Не черный | + |
| Уреаза | Красно-пурпурный | Нет изменения цвета | - |
| Бульон лизин-декарбоксилазы | Пурпурный | Желтый | + |
| Бульон дульцитола фенолового красного | Желтый или газ | Нет изменения цвета или газа | + b |
| Бульон KCN | Рост | Нет роста | - |
| Малонатный бульон | Синий | Нет изменения цвета | - c |
| Тест на индол | Поверхность фиолетового цвета | Поверхность желтого цвета | - |
| Тест на жгутиковый антиген | Агглютинация | Нет агглютинации | + |
| Тест на соматический антиген | Агглютинация | Нет агглютинации | + |
| Бульон лактозы фенолового красного | Желтый или газ | Нет изменения цвета или газа | - c |
| Бульон сахарозы фенолового красного | Желтый или газ | Нет изменения цвета или газа | - |
| Тест Фогес-Проскауэра | От розового до красного | Нет изменения цвета | - |
| Тест на метиловый красный | Рассеянный красный | Рассеянный желтый цвет | + |
| Цитрат Симмонса | Рост синего цвета | Нет роста, нет изменения цвета | v |

a +, 90% или более положительный через 1 или 2 дня; -, 90% или более отрицательный через 1 или 2 дня; v, переменная.

b Большинство культур *S. arizonae* отрицательные.

c Большинство культур *S. arizonae* положительные.

**4.4.6.2** Отчет о результатах

Сообщить: наличие или отсутствие *сальмонеллы* в г или мл пробы.

**Рисунок 1**

**БЛОК-СХЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ САЛЬМОНЕЛЛЫ**



|  |  |
| --- | --- |
| Предварительное обогащение | Preenriquecimiento |
| Обогащение | Enriquecimiento |
| Выделение | Selección |
| Типичные колонии | Colonias tipicas |
| Нет | No |
| Цель | Fin |
| Да | Sí |
| Идентификация | Identificación |
| TSI(-) LIA(-) | TSI(-) LIA(-) |
| TSI(+) LIA(+) | TSI(+) LIA(+) |
| Чистая культура в TSI | Cultivo puro en TSI |
| Нет | No |
| Очистить Moc.HE.XLD | Purificar Moc.HE.XLD |
| Да | Sí |
| Тест на уреазу | Prueba de ureasa |
| Положительный | Positivo |
| Да | Sí |
| Цель | Fin |
| Нет | No |
| Серологическое подтверждение | Confirmación serológica |
| Характерные результаты | Si dan pruebas características |
| Сальмонелла выявлена | Si identifica salmonella |
| Сообщается | Se informa |
| Не может выполняться аутоагглютинацией или не дает характерных результатов | No se puede realizar por autoaglutinacion o no dan pruebas características |
| Это может быть сальмонелла | Puede tratarse de Salmonella |
| Провести дополнительные биохимические испытания | Efectuar pruebas bioquímicas adicionales |
| Проводится анализ результатов | Se efectúa el análisis de resultados |
| Сообщается | Se informa |

**4.5** Метод определения *золотистого стафилококка* в продуктах, подпадающих под настоящий стандарт

**4.5.1** Введение

Рост *золотистого стафилококка* в пищевых продуктах имеет большое значение, поскольку это микроорганизм, способный продуцировать мощный энтеротоксин, который при проглатывании вызывает пищевое отравление.

Среди причин определения *золотистого стафилококка* в пищевых продуктах:

Подтверждение присутствия этого микроорганизма как возбудителя болезни пищевого происхождения.

Определение того, является ли пищевой продукт или ингредиент потенциальным источником этого энтеротоксигенного микроорганизма.

Доказательство постпроизводственного заражения, которое обычно происходит при контакте с человеком или с зараженными поверхностями.

Пищевые продукты, подвергающиеся постпроизводственному заражению энтеротоксигенными типами *золотистого стафилококка*, представляют собой риск из-за отсутствия конкурентной флоры, которая обычно ограничивает рост *золотистого стафиллокока* и выработку энтеротоксина.

Эти виды пищевых продуктов становятся более опасными, если они подвержены неправильному обращению или хранятся при неподходящих температурах.

Скоропортящиеся пищевые продукты, такие как: сырое и обработанное мясо, салаты, кондитерские изделия и молочные продукты, чаще всего приводят к стафилококковому отравлению.

**4.5.2** Основные принципы

Этот метод позволяет сделать оценку содержания *золотистого стафилококка* в пищевых продуктах, которая производится непосредственно в чашках с селективной и дифференциальной культуральной средой с подтверждением тестов на коагулазу и термоядерную среду.

Этот метод подходит для анализа пищевых продуктов, в которых ожидается более 100 клеток *золотистого стафилококка* на г.

**4.5.3** Реагенты и материалы

В случае наличия обезвоженных коммерческих формул следует соблюдать инструкции, напечатанные на соответствующей этикетке для их приготовления.

При упоминании воды следует понимать, что это "дистиллированная вода".

Реагенты, используемые в методе, подпадающем под этот стандарт, должны быть аналитической чистоты.

**4.5.3.1** Реагенты

**i)**  Растворы разбавителей

Фосфатный регуляторный раствор (концентрированный раствор).

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количество** |
| Монокалийфосфат | 34,0 г |
| Вода | 1,0 л |

Приготовление

Разведите фосфат в 500 мл воды и отрегулируйте рН до 7,2 раствором гидроксида натрия 1,0 N, доведите водой до 1 л.

Стерилизуйте в течение 15 мин при 121ºC ±1, храните в холодильнике (концентрированный раствор).

Возьмите 1,25 мл концентрированного раствора и доведите водой до одного литра (рабочий раствор).

Распределите порциями по 99,90 и 9 мл по мере необходимости.

Стерилизуйте при 121ºC ± 1ºC в течение 15 минут.

После стерилизации рН и конечные объемы рабочего раствора должны быть равны начальным.

Пептонированная вода

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количество** |
| Пептон | 1,0 г |
| Хлорид натрия | 8,5 г |
| Вода | 1,0 л |

Приготовление

Разведите компоненты в литре воды.

Отрегулируйте рН до 7,0 раствором гидроксида натрия 1N.

Распределите порциями по 99,90 и 9 мл по мере необходимости.

Стерилизуйте при 121ºC ± 1ºC в течение 15 минут.

После стерилизации рН и конечные объемы рабочего раствора должны быть равны начальным.

**ii)** Культуральные среды

**iii)** Среда Бэрд-Паркера

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количество** |
| Основная средаПодпункт iv) пункта 4.5.3.1 | 95,0 мл |
| Раствор теллурита калия Подпункт v) пункта 4.5.3.1 | 1,0 мл |
| Эмульсия яичного желтка Подпункт vi) пункта 4.5.3.1 | 5,0 мл |

Приготовление

Когда основная среда достигнет 45ºC, добавьте другие ингредиенты и перемешайте. Поместите от 15 до 20 мл готовой среды в чашку, охладите и дайте затвердеть. Чашки могут храниться в течение 48 ч при температуре от 0 до 5ºC.

**iv)** Основная среда Бэрд-Паркера

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количество** |
| Триптон | 10 г |
| Дрожжевой экстракт | 1,0 г |
| Экстракт мяса | 5,0 г |
| Глицин | 12,0 г |
| Хлорид лития | 5,0 г |
| Пируват натрия | 10,0 г |
| Агар | 20,0 г |
| Вода | 1,0 л |

Приготовление

Разведите ингредиенты или базовый агар водой, нагрейте при постоянном помешивании и кипятите в течение 1 мин. Стерилизуйте при 121ºC ± 1ºC в течение 15 минут.

Охладите и держите среду при температуре 45ºC.

**v)** Раствор теллурита

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количество** |
| Теллурит калия | 1,0 г |
| Вода | 100,0 мл |

Приготовление

Разведите теллурит калия водой и стерилизуйте.

Раствор можно хранить в течение нескольких месяцев при температуре от 0 до 5ºC.

**vi)** Эмульсия яичного желтка

Приготовление

Свежие яйца при необходимости вымойте водой с мылом и почистите раствором настойки йода (2% -ный спиртовой раствор) или погрузите в раствор хлорида ртути (1:1000). Промойте стерильной водой и высушите стерильной марлей.

В вытяжном шкафу с ламинарным потоком или в асептических условиях разбейте яйца и вылейте их в стерильный сепаратор белков. Переложите желтки в пробирку объемом до 60 мл и залейте до 90 мл изотоническим физиологическим раствором.

Вылейте эмульсию в колбу Эрленмейера со стерильными стеклянными шариками и сильно встряхните, чтобы сформировать эмульсию.

Процедите в чашки через марлю.

Чашки должны использоваться в течение 48 часов.

**vii)** Изотонический физиологический раствор

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количество** |
| Хлорид натрия | 0,85 г |
| Вода | 100,0 мл |

Приготовление

Растворите ингредиент в воде и стерилизуйте при температуре 121ºC ±1 в течение 15 минут.

**vii)** Бульон настоя мозгов и сердца (BHI)

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количество** |
| Настой из говяжьего мозга | 200,0 мл |
| Настой из говяжьего сердца | 250,0 мл |
| Пептон желатина | 10,0 г |
| Хлорид натрия | 5,0 г |
| Динатрийфосфат додекагидрат | 2,5 г |
| Глюкоза | 2,0 г |
| Вода | 1,0 мл |

Приготовление

Растворите ингредиенты в воде и слегка нагрейте при необходимости. Распределите и стерилизуйте в течение 15 минут при 121ºc ±1.

**iv)** Спиральная дезоксирибонуклеиновая кислота тимуса телятины.

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количество** |
| Спиральная дезоксирибонуклеиновая кислота тимуса телятины или эквивалент | 0,03 г |
| Агар | 1,0 г |
| Безводный хлорид кальция (раствор 0,01 М) (подпункт x пункта 4.5.3.1) | 0,10 мл |
| Хлорид натрия | 1,0 г |
| Толуидиновый синий (раствор 0,1 М) (подпункт xi пункта 4.5.3.1) | 0,30 мл |
| Трис-(гидроксиметиламинометан) (Трис раствор 0,05 м, рН 9)(подпункт xii пункта 4.5.3.1) | 100 мл |

Приготовление

Растворите ингредиенты, кроме толуидинового синего, перемешивая до полного растворения дезоксирибонуклеиновой кислоты, и доведите до кипения.

Добавьте толуидиновый синий. Распределите по маленьким банкам с резиновой пробкой. Стерилизовать не нужно.

Эта среда стабильна при комнатной температуре до 4 месяцев и отлично работает даже после растопления несколько раз.

Возьмите чистое предметное стекло и добавьте 3 мл растопленной среды, размазав ее по поверхности.

Когда агар затвердеет, сделайте отверстия кончиком пипетки Пастера.

Храните в холодильнике, чтобы избежать обезвоживания.

**x)** Безводный раствор хлорида кальция 0,01 М

Хлорид кальция PM = 110,99

Растворите 0,1199 г хлорида кальция в 100 мл воды.

**xi)** Раствор толуидинового синего 0,1 М

Растворите 3,05 г толуидинового синего в 100 мл воды.

**xii)** Буферный раствор 0,05 м Трис-(гидроксиметиламинометан)

(Трис pH 9) PM = 121,1

Растворите 6,055 г Трис в 100 мл воды.

**xii)** Биологический реагент:

Плазма кролика

Используйте обезвоженную или регидратированную плазму кролика в соответствии с инструкциями производителя и добавьте этилендиаминтетраксусную кислоту (ЭДТА) в 0,1% растворе в регидратированную плазму. При использовании обезвоженной плазмы, ее разбавляют стерильной водой в соотношении 1:3.

Можно использовать лиофилизированную плазму кролика с добавлением ЭДТА. Цитратную кровь использовать нельзя.

**4.5.3.2** Материалы

Все инструменты, используемые для работы с пробой, должны быть простерилизованы в печи в течение 2 ч при температуре 170-175°С или, в качестве альтернативы, в автоклаве не менее 15 мин при температуре 121°С ±1.

Ножи, щипцы, ножницы, ложки, шпатели и сепаратор яиц.

Пробирки для культивирования размером 16 мм x 150 мм или флаконы емкостью от 125 до 250 мл.

Пробирки для культивирования размером 10 мм x 75 мм

Чашки Петри диаметром от 90 до 100 мм.

Бактериологические пипетки емкостью 1 мл и 10 мл, с градацией 0,1 мл и 1 мл соответственно и диаметром от 2 до 3 мм.

Пипетки Пастера.

Пробирки.

Стеклянные палочки диаметром около 3,5 мм и длиной 20 см, согнутые под прямым углом.

Колба Эрленмейера со стеклянными шариками

Влажная камера: состоящая из чашки Петри, в которую помещена V-образная стеклянная палочка, окруженная ватой, смоченной водой.

**4.5.4** Приборы

Печь для стерилизации при 180ºC

Автоклав с термометром.

Водяная баня с регулятором температуры 35 ± 0,5 ºC.

Водяная баня с регулятором температуры 45 ± 0,5 ºC.

Весы с емкостью не более 2500 г и чувствительностью 0,1 г.

Инкубатор при 35 ± 1ºC.

**4.5.5** Подготовка пробы

Подготовка пробы должна производиться в соответствии с положениями B. 6.1 "Подготовка и разведение проб пищевых продуктов для микробиологического анализа".

**4.5.6** Процедура

**4.5.6.1** Используя различные пипетки по 1 мл для каждого разведения, нанесите 0,1 мл на поверхность чашек с агаром Бэрд-Паркера.

**4.5.6.2** Распределите посевной материал на поверхности агара стерильными стеклянными палочками, согнутыми под прямым углом, используя по одной для каждого разведения.

**4.5.6.3** Держите чашки на месте до тех пор, пока посевной материал не будет поглощен агаром.

**4.5.6.4** Переверните чашки и инкубируйте от 45 до 48 ч при 35ºC.

**4.5.6.5** Выберите чашки, которые имеют от 15 до 150 колоний, типичных для *золотистого стафилококка*; если это невозможно, выберите чашки с самыми высокими разведениями, даже если они имеют более 150 колоний.

**4.5.6.6** Если чашки имеют менее 15 типичных колоний, они также могут быть использованы, и в отчет следует добавить примечание "ориентировочное значение".

**4.5.6.7** Типичные колонии черные, круглые, блестящие, выпуклые, гладкие, диаметром от 1 до 2 мм и имеют непрозрачную зону и светлый ореол вокруг колонии.

**4.5.6.8** Выберите колонии в соответствии со следующей таблицей для проведения тестов на коагулазу и термоядерность:

**ТАБЛИЦА**

|  |  |
| --- | --- |
| **Количество подозрительных колоний в чашке** | **Количество колоний, которые нужно протестировать** |
| Менее 50 | 3 |
| От 51до 100 | 5 |
| От 101 до 150 или более | 7 |

**4.5.6.9** Выберите количество колоний и посейте каждое в пробирки с 0,5 мл бульона настоя мозгов и сердца.

**4.5.6.10** Инкубируйте при 35ºC в течение 24 часов.

**4.5.6.11** Засейте в той же форме известные штаммы *золотистого стафилококка* и *эпидермального стафилококка* в качестве положительного и отрицательного контроля.

**4.5.6.12** После инкубационного периода поместите 0,3 мл каждой культуры пипеткой емкостью 1 мл в другую пробирку размером 10 мм х 75 мм и сохраните ее для термоядерного теста. Остальная часть культуры используется для теста на коагулазу.

**4.5.6.13** Тест на коагулазу.

**i)** Добавьте к 0,2 мл предыдущей культуры 0,2 мл плазмы кролика, разбавленной 1:1 стерильным физиологическим раствором.

**ii)** Инкубируйте на водяной бане при температуре 35-37°С и наблюдайте в течение 6 часов с интервалом в 1 час; если нет образования сгустка, проверьте через 24 часа. Считайте тест положительным, если есть образование сгустка.

Для проверки свертываемости кроличьей плазмы добавляют каплю 5%-ного хлорида кальция к 0,5 мл восстановленной плазмы с образованием сгустка через 10-15 сек.

**4.5.6.14** Термоядерный тест

**i)** Нагрейте в течение 15 мин, 0,3 мл культуры в бульоне настоя мозгов и сердца на кипящей водяной бане.

**ii)** Пропустите одну каплю каждой культуры с помощью пипетки Пастера в отверстие в среде, включая контрольную.

**iii)** Инкубируйте при температуре 35ºC во влажной камере в течение 4-24 часов.

**iv)** Появление расширенного розового ореола размером не менее 1 мм вокруг отверстия оценивается как положительное.

**4.5.7** Вычисление и выражение результатов

**4.5.7.1** Расчет

Сделайте расчет содержания микроорганизмов в продукте с учетом общего количества колоний, количества подтвержденных колоний, разведения и засеянного объема (0,1 мл).

Пример 1:

Если чашка имеет 80 колоний в разведении 1:1000

Для анализа берут 5 колоний, из которых 4 дают положительный результат, расчет:

80 x 4 = 64 x 1000 x 10 = 640 000

5

Пример 2:

Если чашка имеет 14 колоний в разведении 1:10

Для анализа берут 3 колонии, из которых 2 дают положительный результат, расчет:

14 x 2 = 9,3 x 10 x 10 = 930

3

**4.5.7.2** Выражение результатов:
 согласно примеру 1:

Укажите как *золотистый стафилококк* 640 000 КОЕ/г

Согласно примеру 2:

Укажите как *золотистый стафилококк* 930 КОЕ/г "ориентировочное значение"

Если подтверждающие тесты окажутся отрицательными у всех протестированных колоний, укажите, как:

0 КОЕ/г в прямых пробах

-10 КОЕ/г в пробах разведения 1:10

-100 КОЕ/г в пробах разведения 1:100

На практике результаты могут варьироваться, это будет зависеть от специалиста, работающего с методом, и степени надежности метода, которая в 95% случаев составляет от ± 16% до ± 52%.

**4.6** Метод подсчета плесени и дрожжей в пищевых продуктах

**4.6.1** Основные принципы

Метод основан на засеве известного количества тестовой пробы в специфическую селективную среду, подкисленную до рН 3,5 и инкубированную при температуре 25 ± 1°С, что приводит к росту колоний, характерных для этого типа микроорганизмов.

**4.6.2** Реагенты и материалы

**4.6.2.1** Реагенты

Указанные ниже реагенты должны быть аналитической чистоты, и когда указывается вода, ее следует понимать как дистиллированную воду.

**i)** Культуральные среды

Картофельно-декстрозный агар, коммерчески доступный в обезвоженном виде.

Подготовка культуральной среды.

Следуйте инструкциям производителя и после стерилизации охладите на водяной бане до 45 ± 1°C, подкислите до рН 3,5 ± 0,1 10%-ной стерильной винной кислотой (около 1,4 мл винной кислоты на 100 мл среды). После добавления раствора смешайте и измерьте РН с помощью потенциометра. Дайте одной порции среды затвердеть. Проделайте это с каждой партией подготовленной среды. Чтобы сохранить гелеобразующие свойства среды, не нагревайте ее после добавления винной кислоты.

**4.6.2.2** Растворы.

**i)** Фосфатный регуляторный раствор (концентрированный раствор).

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Одноосновный фосфат калия | 34,0 г |
| Вода | 1,0 л |

Приготовление:

Растворите фосфат в 500 мл воды и отрегулируйте рН до 7,2 раствором гидроксида натрия 1 N.

Доведите водой до 1,0 л.

Стерилизуйте при 121°C в течение 15 минут. Держите в холодильнике (концентрированный раствор).

Возьмите 1,25 мл концентрированного раствора и доведите водой до 1,0 литра (рабочий раствор).

Распределите порциями по 99,90 и 9 мл по мере необходимости.

Стерилизуйте при 121° ± 1°C в течение 15 минут.

**ii)** Стерильный раствор 10%-ной винной кислоты

|  |
| --- |
| **Формула** |
| **Ингредиенты** | **Количества** |
| Винная кислота | 10 г |
| Дистиллированная вода | 100 мл |

Приготовление:

Растворите кислоту в воде и стерилизуйте при 121 ± 1,0 ° C в течение 15 минут или путем фильтрации через мембрану 0,45 м.

**4.6.2.3** Материалы.

Бактериологические пипетки для распределения по 10 и 1 мл (или при необходимости по 1 мл и 2 мл), с ватным тампоном. Могут использоваться пипетки градуированные в объемах, равных одной десятой от их общего объема.

Чашки Петри.

Флаконы из желтого стекла объемом 250 мл с завинчивающейся крышкой.

Пробирки 16 x 150 мм с завинчивающейся крышкой.

Стерилизуемая посуда для отбора проб: ножи, пинцет, ножницы, ложки, шпатели и т. д.

Все материалы и инструменты, контактирующие с исследуемыми пробами, должны быть простерилизованы в:

Печи в течение 2 ч при 170 - 175°C или 1 ч при 180°C, или в автоклаве в течение 15 минут при не менее 121 ± 1,0°C.

**4.6.3** Приборы и инструменты

Печь для стерилизации, достигающая минимальной температуры 170°C.

Инкубатор с термостатом, который должен поддерживаться при температуре 25 ± 1,0°C, снабженный калиброванным термометром.

Автоклав, достигающий минимальной температуры 121 ± 1,0°C.

Водяная баня с контролем температуры и механической циркуляцией, снабженная калиброванным термометром с делениями 0,1°C и поддерживающая температуру 45 ± 1,0°C.

Счетчик колоний в темном поле с достаточным освещением, клетчатой ​​стеклянной чашкой и увеличительной линзой.

Механический или электронный регистратор.

Оптический микроскоп.

Потенциометр с минимальной шкалой 0,1 единицы рН при 25 °C.

**4.6.4** Подготовка пробы

Подготовка пробы должна осуществляться в соответствии с пунктом 4.1 (процедура приготовления и разведения проб пищевых продуктов для микробиологического анализа) настоящего нормативного приложения.

**4.6.5** Процедура

**4.6.5.1** Поместите 1 мл жидкой пробы прямого разведения или первичного разведения в чашки Петри в двух экземплярах, используя для этого стерильную пипетку.

**4.6.5.2** Повторите процедуру столько раз, сколько десятичных разведений требуется посеять, используя другую стерильную пипетку для каждого разведения.

**4.6.5.3** Налейте от 15 до 20 мл подкисленного картофельно-декстрозного агара, растопленного и выдержанного при температуре 45 ± 1°С на водяной бане. Время, прошедшее между приготовлением первичного разведения и временем заливки культуральной среды, не должно превышать 20 минут.

**4.6.5.4** Тщательно смешайте среду шестью движениями справа налево, шестью по часовой стрелке, шестью против часовой стрелки и шестью назад вперед, на гладкой поверхности. Дайте смеси затвердеть, поместив чашки Петри на холодную горизонтальную поверхность.

**4.6.5.5** Подготовьте контрольную чашку с 15 мл среды для проверки стерильности.

**4.6.5.6** Переверните чашки и поместите их в инкубатор при температуре 25 ± 1°C.

**4.6.5.7** Подсчитайте колонии в каждой чашке после 3, 4 и 5 дней инкубации. Через 5 дней выберите те чашки, которые содержат от 10 до 150 колоний. Если какая-либо часть чашки показывает расширенный рост плесени или трудно подсчитать хорошо изолированные колонии, рассмотрите предыдущий подсчет на 4-й день инкубации или даже на 3-й день. В этом случае укажите инкубационный период 3 или 4 дня в результатах анализа.

**4.6.5.8** При необходимости, когда колониальной морфологии недостаточно, рассмотрите под микроскопом, чтобы отличить дрожжевые колонии и плесень от бактерий.

**4.6.6** Выражение результатов
 Метод вычисления

Рассмотрите чашки с 10-150 колониями как подходящие для отчета.

Умножите на обратное разведение, принимая во внимание критерии пункта 4.2 этого приложения (метод подсчета аэробных бактерий в чашках), для выражения результатов.

**4.6.7** Отчет по тестированию

Укажите:

Колониеобразующие единицы на грамм или миллилитр (КОЕ/г или мл) плесени в подкисленном картофельно – декстрозном агаре, инкубированные при 25 ± 1°С в течение 5 дней.

Колониеобразующие единицы на грамм или миллилитр (КОЕ/г или мл) дрожей в подкисленном картофельно – декстрозном агаре, инкубированные при 25 ± 1°С в течение 5 дней.

**5 Метод тестирования для определения кадмия, свинца, железа и цинка в продуктах, подпадающих под настоящий стандарт, с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии.**

**5.1** Введение

Наличие определенных химических элементов в пищевых продуктах, напитках, питьевой воде и очищенной воде представляет серьезную проблему для здоровья человека из-за их токсичности.

**5.2** Основные принципы

Метод атомной абсорбции основан на пропускании монохроматического луча света с такой частотой, что он может быть поглощен аналитом, который присутствует в виде атомного пара. Измерение интенсивности света до и после его прохождения через атомный пар позволяет определить процент абсорбции.

Количество абсорбции увеличивается с концентрацией атомов в абсорбирующей среде, то есть мера поглощения увеличивается с концентрацией элемента в пробе, независимо от того, находится ли он в своем первоначальном состоянии или подвергается предварительной обработке.

**5.3** Реагенты и материалы
**5.3.1** Реагенты

Сертифицированные эталонные стандартные растворы каждого из металлов.

Вода должна быть деионизирована, с максимальной степенью проводимости 1 мкм/см при 25ºC.

Азотная кислота (удельная плотность 1,41) сверхвысокой степени чистоты.

Азотная кислота (удельная плотность 1,41) с очень низким содержанием ртути.

Хлорная кислота (удельная плотность 1,67) сверхвысокой степени чистоты.

Соляная кислота (удельная плотность 1,19) сверхвысокой степени чистоты.

Серная кислота (удельная плотность 1,84) сверхвысокой степени чистоты.

Серная кислота 1 N со сверхвысокой степенью чистоты раствора.

Азотная кислота 65% о/о класса RA.

Перекись водорода (удельная плотность 1,12).

Гидроксид натрия дробленого - реагент RA.

Сухой и чистый сжатый воздух.

Газы: ацетилен, закись азота, аргон и азот, степень атомной абсорбции.

7%-ный раствор гексагидрата нитрата магния в/о Растворите 70 г Mg(NO3) 2. 6H2O в 1000 мл HCl 1 N.

Соляная кислота 1 N. Разведите 8,3 мл HCl водой до 100 мл.

50%-ная азотная кислота о/о. Разведите 50 мл 65%-ного HNO3 о/о сверхвысокой степени чистоты в 50 мл воды.

Соляная кислота 8 М. Разведите 66,0 мл HCl водой до 100 мл.

Соляная кислота 0,5 N. Разведите 4,15 мл HCl водой до 100 мл.

15%-ный раствор йодида калия в/о. Растворите 15 г KL в 100 мл воды (этот раствор необходимо приготовить во время использования).

20%-ный раствор йодида калия в/о. Растворите 20 г KL в 100 мл воды (этот раствор необходимо приготовить во время использования).

Раствор хлорида калия (10 мг/мл К). Растворите 1,91 г KCl в воде и разведите водой до 100 мл.

50%-ный раствор нитрата магния в/о. Разведите 50 г Mg(NO3)2.6H2O в 100 мл воды.

1,5%-ный раствор соляной кислоты в/о. Разведите 1,5 мл HCl в 100 мл деионизированной дистиллированной воды.

1%-ный раствор гидроксида натрия в/о. Взвесьте 1 г гидроксида натрия и разведите до 100 мл деионизированной дистиллированной водой.

4%-ный раствор борогидрида натрия в/о в 1%-ном растворе гидроксида натрия в/о. Взвесьте 4 г борогидрида натрия в 100 мл 1%-ного раствора гидроксида натрия в/о. Отфильтруйте под вакуумом.

Восстановительный раствор для ртути. Смешайте 50 мл концентрированной серной кислоты с примерно 300 мл воды. Охладите до комнатной температуры и растворите 15 г хлорида натрия, 15 г сульфата или хлорида гидроксиламина и 25 г хлорида или сульфата олова в растворе. Разведите водой до 500 мл.

Раствор разбавителя для ртути. В колбу объемом 1 л, содержащую от 300 до 500 мл деионизированной дистиллированной воды, добавьте 58 мл концентрированной азотной кислоты с очень низкой концентрацией ртути и 67 мл концентрированной серной кислоты. Разведите водой до полного объема.

Рабочий раствор As 1 мкг/мл. Разведите 1 мл стандартного раствора с концентрацией 1000 мкг/мл до 1 л серной кислотой 1N, приготовленной из раствора сверхвысокой степени чистоты. Готовьте его каждый день в свежем виде.

**5.3.2** Материалы

Колбы Кьельдаля емкостью 500 мл и 800 мл.

Система рефлюкса с хладагентом.

Тигли Vycor емкостью от 40 до 50 мл.

Платиновые тигли емкостью от 40 до 50 мл.

Колбы Эрленмейера различной емкости.

Объемные колбы различной емкости.

Круглые колбы 50 мл с плоским дном.

Насосы Parr.

Микропипетки или пипетки Эппендорфа различной емкости.

Пластиковые наконечники для микропипеток.

Фильтровальная бумага Ватман № 2.

Шарики для варки.

Пластиковые палочки.

Градуированные пробирки из пропилена емкостью 15 мл.

Пропиленовые контейнеры.

Фильтрующие воронки различной емкости.

Общий лабораторный материал.

Весь используемый материал должен быть промыт в соответствии со следующими инструкциями.

Используемое мыло должно быть предпочтительно нейтральным.

Тщательно промойте под проточной водой.

Погрузите стеклянный или пластиковый материал в контейнер (желательно пластиковый), содержащий 30%-ный раствор азотной кислоты класса RA.

Закройте контейнер и оставьте на 24 часа.

Удалите излишки азотной кислоты несколькими полосканиями (5 или 6 раз) деионизированной водой.

Дайте стечь и высохнуть.

Уберите на хранение сразу после высыхания, чтобы избежать загрязнения частицами воздуха.

**5.4** Приборы и инструменты

**5.4.1** Приборы

Безэлектродные полые катодные или разрядные лампы для определения мышьяка, кадмия, меди, олова, огнеупора, ртути, свинца и цинка.

Источник радиочастоты при использовании газоразрядных ламп.

Автосамплер и рециркулятор воды.

Нагревательная пластина с регулятором, который достигает температуры от 400 до 450ºC.

Микроволновая печь.

Автоклав, достигающий 121 ± 5ºC или 15 фунтов давления.

Лабораторная центрифуга, способная поддерживать 1600 об/мин.

**5.4.2** Инструменты

Следующие инструменты должны быть откалиброваны и отрегулированы перед эксплуатацией.

Атомно-абсорбционный спектрометр оснащен аксессуарами для пламени, графитовой печи, гидридного генератора или генератора холодного пара, в зависимости от применяемого метода.

Аналитические весы с чувствительностью 0,1 мг.

Муфель способен поддерживать температуру 550 ± 10ºC.

Нагревательная печь (камера) с температурным диапазоном 120 ± 5ºC.

**5.5** Подготовка пробы

**5.5.1** Расщепление для определения Cd, Fe, Pb и Zn.

**5.5.1.1** Влажное расщепление.

**i)** Взвесьте с точностью ± 0,1 мг соответствующее количество пробы.

Для определения методом поглощения пламенем взвесьте не более 20 г пищевого продукта, содержащего от 50 до 75% воды, и 10 г твердого или полутвердого пищевого продукта. Ограничьте содержание жира или масла до максимум 4 г, а общее количество органического вещества - до 5 г.

**ii)** Добавьте 10 мл концентрированной азотной кислоты и оставьте на ночь или непосредственно приступите к расщеплению.

**iii)** Используйте колбу Кьельдаля или колбу, подключенную к системе хладагентов.

**iv)** Осторожно нагрейте.

**v)** Расщепляйте пробу 3 часа или дольше, если необходимо (некоторые пробы требуют добавления большего количества азотной кислоты), пока не появится полупрозрачный цвет, если он остается желтым, добавьте по каплям перекись водорода при непрерывном перемешивании (экзотермическая реакция).

**vi)** Дайте остыть.

**vii)** Соберите, отфильтруйте и доведите до полного объема в объемной колбе.

**viii)** Проведите холостой опыт реагента и обогащенной пробы для каждого расщепления.

**ix)** Считайте с выбранного устройства (пламенный атомно-абсорбционный спектрометр или графитовая печь).

**5.5.1.2** Сухое расщепление.

**i)** Взвесьте с точностью ± 0,1 мг соответствующее количество пробы.

Для определения методом поглощения пламенем взвесьте не более 20 г пищевого продукта, содержащего от 50 до 75% воды, и 10 г твердого или полутвердого пищевого продукта. Ограничьте содержание жира или масла до максимум 4 г, а общее количество органического вещества - до 5 г.

**ii)** Добавьте 10 мл концентрированной азотной кислоты и оставьте на ночь или непосредственно приступите к расщеплению. В продукты с высокой концентрацией белка добавьте 7,0%-ный раствор нитрата магния в/о и тщательно перемешайте, доведите до сухого состояния в течение около 6 часов в печи при температуре от 90 до 95ºC.

**iii)** Поместите пробу в муфель и медленно прибавляйте температуру от 2 до 4ºC в минуту до 350°C. Поддерживайте температуру до тех пор, пока пары не прекратят выделяться.

**iv)** Постепенно повышайте температуру с 500 до 550°С во избежание сжигания пробы и поддерживайте эту температуру в течение 16 часов или в течение ночи.

**v)** Выключите муфель и дайте остыть.

**vi)** Второй этап прокаливания может потребоваться для удаления некоторых остатков угля с помощью следующей процедуры:

Вымойте стенки тигля 2 мл 50%-ной азотной кислоты. Поместите пробу на нагревательную пластину, установленную на 120ºC, чтобы удалить лишнюю кислоту. Поместите пробу в холодный муфель и постепенно повышайте температуру от 500 до 550ºC, держа пробу в муфеле в течение необходимого времени. Повторите эту процедуру столько раз, сколько необходимо, пока не останется только зола.

**vii)** Полностью растворите золу в 5 мл соляной кислоты 1N, перелейте растворенную пробу в пропиленовую пробирку или колбу указанного объема, промойте тигель двумя аликвотами по 5 мл соляной кислоты 1 N и перелейте в ту же пробирку или колбу, чтобы получить объем 15 мл в первой и довести до полного объема во второй, закройте и перемешайте, если есть частицы или нерастворимые вещества, профильтруйте через бумагу Ватман № 2 перед определением.

**viii)** Проведите холостой опыт реагента и обогащенной пробы для каждого расщепления.

**ix)** Считайте с выбранного устройства (пламенный атомно-абсорбционный спектрометр или графитовая печь).

**5.5.2** Расщепление для определения Cd, Pb, Fe и Zn с помощью микроволновой печи.

Взвесьте с точностью ± 0,1 мг, максимум 0,500 г пробы, добавьте 6 мл концентрированной азотной кислоты и 2 мл воды, насыщенной кислородом на 30%, плотно закройте реакционный сосуд и действуйте в соответствии с руководством производителя.

**5.6** Процедура

**5.6.1** Атомно-абсорбционная спектрометрия в пламени.

**5.6.1.1** Калибровка. Необходимо проверить, что у вас есть приемлемая начальная и периодическая калибровка.

**i)** Начните с рабочей конфигурации прибора и системы сбора данных. Дайте безэлектродным газоразрядным лампам прогреться не менее 30 минут.

**ii)** Стабильность прибора должна быть проверена путем анализа стандартного раствора, в 20 раз более концентрированного, чем Предел обнаружения прибора (LDI) для аналита, считанного не менее пяти раз с расчетом результирующего стандартного отклонения, которое должно быть менее 5%.

**iii)** Прибор должен быть откалиброван для аналита, подлежащего определению, с использованием холостого опыта калибровки и стандартов калибровки, подготовленных на 3 или 4 уровнях концентрации в пределах динамического диапазона концентрации аналита.

**iv)** Установите прибор на 0 с помощью холостого опыта калибровки. Введите калибровочные стандарты аналита от самой низкой до самой высокой концентрации и запишите по крайней мере три повтора оптической плотности каждого из них.

**v)** Составьте кривую калибровки путем построения графиков оптической плотности в зависимости от концентрации. Вышеизложенное может быть выполнено на оборудовании, которое программируется напрямую, в котором необходимо только ввести стандарты и отметить их теоретическую концентрацию.

**5.6.1.2** Использование прибора.

Производительность прибора проверяется с помощью холостого опыта калибровки, стандартов калибровки и Пробы контроля качества (MCC).

**i)** После калибровки прибор должен быть проверен на правильность работы для аналита. Для этого анализируется проба контроля качества. Если измерения отличаются на ± 10% или более от значения, установленного для MCC, анализ необходимо прервать и найти возможную причину ошибки, выполнить повторную калибровку прибора и подтвердить новую калибровку.

**ii)** Чтобы убедиться, что прибор не имеет дрейфа, для каждого 10 анализа необходимо проанализировать холостой опыт калибровки. Если истинное значение аналита отличается на ± 10% или более, прибор должен быть перекалиброван. Если ошибка сохраняется, проблема должна быть выявлена и исправлена.

Если матрица пробы влияет на дрейф или реакцию аналита, может потребоваться работа со стандартными добавками.

**iii)** Определение начальной работоспособности прибора осуществляется путем установления Пределов обнаружения метода (LDM) для аналита и линейного интервала калибровки. Для определения LDM используется холостой опыт реагента, обогащенного аналитом с концентрацией, в 2–5 раз превышающей расчетный предел обнаружения. На протяжении всего аналитического метода делают не менее 4 повторных измерений оптической плотности обработанного холостого опыта обогащенного реагента. LDM рассчитывается в соответствии с:

LDM= t x s

t = значение «T» Стьюдента при доверительном интервале 99% и предполагаемом стандартном отклонении.

для n-1 степеней свободы. t = 3,14 для 7 повторов.

s = стандартное отклонение повторов анализа.

Линейный интервал калибровки устанавливается по крайней мере для 4 стандартов различной концентрации, один из которых должен быть близок к верхнему пределу линейного интервала.

**5.6.1.3** Определение

**i)** Отрегулируйте атомно-абсорбционный прибор в условиях, подходящих для определения аналита, в соответствии с указаниями в руководстве к прибору.

**ii)** Введите холостой опыт реагентов и пробу для анализа и запишите значения оптической плотности. По крайней мере один холостой опыт реагента должен быть проанализирован для каждой группы проб. Полученные значения свидетельствуют о качестве использованных реагентов и степени загрязнения лаборатории.

**iii)** На оборудовании, которое может быть запрограммировано, полученное считывание непосредственно указывает концентрацию элемента в используемых единицах концентрации.

**iv)** По крайней мере один холостой опыт обогащенного реагента должен быть проанализирован для каждой группы проб. Точность рассчитывается как процент извлечения (в соответствии с подпунктом vi пункта 5.6.1.3).

**v)** По крайней мере, одна проба на группу или 10% из них, в зависимости от того, что больше, должны быть обогащены. Добавленная концентрация должна составлять приблизительно 0,1 единицы оптической плотности.

**vi)** Процент извлечения аналита должен быть рассчитан в соответствии с:



R = % извлечения

CM = концентрация обогащенной пробы

C = концентрация пробы

CA = эквивалентная концентрация аналита, добавленного к пробе.

Если извлечение аналита в обогащенной пробе находится за пределами ранее установленного интервала, а холостой опыт обогащенного реагента верен, может возникнуть проблема, связанная с матрицей пробы. Данные должны быть проверены методом стандартных дополнений.

**5.6.2** Атомно-абсорбционная спектрометрия в графитовой печи.

**5.6.2.1** Калибровка.

**i)** Действуйте в соответствии с подпунктами i) - iv) пункта 5.6.1.1

**ii)** Составьте кривую калибровки путем построения графика пиковой площади или максимальной высоты против концентрации аналита.

Допускается калибровка с помощью компьютера или калькулятора на основе подбора данных реакции на концентрацию.

Вышеизложенное может быть выполнено на оборудовании, которое программируется напрямую, в котором необходимо только ввести стандарты и отметить их теоретическую концентрацию.

**5.6.2.2** Использование прибора.

**i)** Действуйте в соответствии с подпунктами i) - iii) пункта 5.6.1.2

**5.6.2.3** Определение.

**i)** Отрегулируйте атомно-абсорбционный прибор в условиях, подходящих для определения аналита, в соответствии с указаниями в руководстве к прибору.

Температурная программа графитовой печи может варьироваться в зависимости от матрицы пробы. В случае неспецифических помех (молекулярное поглощение или рассеяние света) рекомендуется ознакомиться с существующей литературой о методах их устранения, а также в случае матричных помех.

**5.6.3** Атомно-абсорбционная спектрометрия с помощью гидридного генератора.

**5.6.3.1** Калибровка.

**i)** Действуйте в соответствии с подпунктами i) - iv) пункта 5.6.

**ii)** Из стандартного раствора As с концентрацией 1000 мг/л приготовьте раствор As с концентрацией 1 мг/л в соляной кислоте соответствующей концентрации для метода. Постройте кривую калибровки оптической плотности (максимум высоты пика) как функцию концентрации аналита для диапазона концентраций от 0 до 10 мкг/л As при тех же условиях матрицы пробы.

**5.6.3.2** Использование прибора.

**i)** Действуйте в соответствии с подпунктами i) - iii) пункта 5.6.1.2

**5.7** Выражение результатов

Метод расчета.

Интерполируйте значения оптической плотности или высоты пика аналита на кривой калибровки и получите мг/кг элемента в пробе и выполните вычисления по следующей формуле:

|  |  |
| --- | --- |
| мг / кг = |  |

где:

А = концентрация в мг/кг пробы, подлежащей интерполяции на кривой калибровки.

B = конечный объем, в который была добавлена проба (мл).

C = Вес пробы (г) или объем пробы (мл) в случае воды.

На оборудовании, которое может быть запрограммировано, полученное считывание непосредственно указывает концентрацию элемента в мг/кг или мкг/кг.

**5.8** Отчет по тестированию

Результаты будут представлены в мг/кг или мкг/кг элемента, подлежащего определению.

**6 Определение витамина B1 и B2 с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения (ВЭЖХ).**

**6.1** Основные принципы

Витамин B1 извлекается из пробы кислотным гидролизом и окисляется до тиохрома, его содержание определяется ВЭЖХ в обратной фазе флуорометрическим способом.

**6.2** Реагенты и материалы
**6.2.1** Реагенты

Дымящаяся соляная кислота, 37% для анализа (HCl).

Тригидрат ацетата натрия, для анализа. (CH3 . CO2Na . 3H2O).

Орто-фосфорная кислота PO4H3 (P2O5 . 3H2O).

Феррицианид калия, для анализа Fe(CN)6K4. 3H2O.

Гидроксид натрия в чечевице, для анализа.

Моногидрат тиамина (нитрат тиамина, моногидрат витамина B1), пищевой сорт (C12H17N5O4S).

Растворимый папаин.

Амилаза.

Диастаза.

N,N-диметилформамид HCON (CH3)2.

фосфат, де-калиевая кислота, для анализа (K2HPO4. 3H2O).

**6.2.2** Материалы.

Колбы грушевидной формы, 100 мл.

Шестигранные полые заглушки.

Мерные стеклянные колбы 1000, 100, 50 и 10 мл.

Стеклянные воронки диаметром 100 мм.

Колбы Эрленмейера, узкое горлышко, 250 мл.

Хладагент Allihn, шланг 300 мм.

Гофрированные фильтры среднего диаметра 185 мм.

Мерные пипетки с отметкой 2, 3, 5 и 40 мл.

Градуированные до наконечника пипетки 1 мл: 0,005.

Градуированные пробирки, высокие, 50 мл:0,5; 100 мл:1,0; 1000 мл:10,0

Весь стеклянный материал должен быть актиничным или покрытым алюминиевой фольгой.

**6.2.3** Аппаратура и инструменты
 Весы аналитические, 162 г, точность 0,1 мг.

Электронные прецизионные весы, 2100 г, точность 0,01 г.

Баня водяная проточная с подставками на 6 мест.

Лабораторная печь.

Шприц для ВЭЖХ, 1 мл.

Игла для шприца.

Колонка ODS или C 18, 5 мкм, 250 X 4,6 мм; или эквивалент.

Устройство фильтрации на мембране.

Мембрана для фильтра.

**6.4** Подготовка растворов

**6.4.1** Раствор соляной кислоты

В колбу объемом 1000 мл, содержащую около 500 мл дистиллированной воды, осторожно добавьте 82 мл 37%-ной соляной кислоты и доведите до полного объема дистиллированной водой. Работайте в вытяжном шкафу.

**6.4.2** Раствор ацетата натрия, 2,5 М

В колбе объемом 1000 мл разведите 340 г тригидратированного ацетата натрия в дистиллированной воде и доведите до полного объема.

**6.4.3** Гидроксид натрия, раствор 150 г/л.

В мерной колбе на 1000 мл растворите 160 г гидроксида натрия в чечевице в дистиллированной воде, доведите до полного объема.

Держите в колбе, снабженной полиэтиленовой пробкой.

**6.4.4** Окислительный раствор

**6.4.4.1** Раствор феррицианида калия 1г/100мл.

В мерной колбе объемом 100 мл растворите 1 г феррицианида калия в дистиллированной воде и доведите до полного объема.

**6.4.4.2** Раствор нужно готовить непосредственно перед использованием

В мерной колбе объемом 50 мл доведите 2 мл раствора 6.4.4.1 раствором 6.4.3. до полного объема

**6.5** Подвижная фаза для ВЭЖХ

**6.5.1** Раствор кислого фосфата калия, 10 мМ, pH 7,2.

В стакане 1000 мл взвесьте ровно 2,28 г фосфата калия, разведите примерно в 800 мл дистиллированной воды. Отрегулируйте рН до 7,2 соляной кислотой 1 N (6.4.1). Перелейте в мерную колбу емкостью 1000 мл и доведите до полного объема дистиллированной водой. Дегазируйте при пониженным давлении и отфильтруйте.

**6.5.2** 15%-ный раствор диметилформамида в кислом фосфате калия.

В мерную колбу емкостью 1000 мл добавьте 150 мл диметилформамида и доведите до полного объема раствором 6.5.1.

**6.6** Стандартный раствор витамина B1

**6.6.1** Концентрированный раствор

В стеклянной мерной колбе объемом 50 мл взвесьте ровно 50,0 мг моногидрата тиамина и разведите дистиллированной водой. Добавьте 5 мл соляной кислоты 1 Н (6.4.1) и доведите до полного объема дистиллированной водой. Этот раствор содержит 1 мг/мл.

**6.6.2** Разбавленные растворы

В мерную колбу объемом 50 мл наберите пипеткой 5 мл раствора 6.6.1 и доведите до полного объема дистиллированной водой. Затем с помощью пипетки наберите 5 мл этого раствора (100 мкг/мл) в мерную колбу емкостью 50 мл и доведите до полного объема дистиллированной водой. Этот раствор содержит 10 мкг/мл. Затем с помощью пипетки наберите 5 мл этого раствора в мерную колбу емкостью 50 мл и доведите до полного объема дистиллированной водой. Этот раствор содержит 1 мкг/мл.

**6.6.3** Таким же образом приготовьте концентрированный раствор рибофлавина, а затем и разбавленные растворы. Нет необходимости использовать стеклянные колбы.

**6.6.4** Окисленный стандартный раствор для ВЭЖХ

Пипеткой налейте 5 мл раствора 6.6.2 в стеклянную мерную колбу емкостью 10 мл. Добавьте 3 мл основного раствора феррицианида калия (6.4.4.2). Перемешивайте в течение 2 минут, добавьте 0,45 мл концентрированной фосфорной кислоты, перемешайте, охладите и доведите до полного объема дистиллированной водой. Немедленно хроматографируйте этот раствор.

**6.7** Процедура

Витамин B1 нечувствителен к свету в отличие от окисленного продукта - тиохрома. На стадии окисления используйте актиничную стеклянную посуду или обычную стеклянную посуду, защищенную алюминиевой фольгой.

**6.7.1** Исследуемая проба

Гомогенизируйте всю пробу, смешивая или измельчая и взвешивая с точностью до 10 мг пробу 5 г.

Для определения витамина В2 добавьте 0,5 г амилазы и 0,25 г папаина, независимо от того, содержит продукт крахмал или нет.

**6.7.1.1** Крахмалистые продукты

В грушевидной колбе объемом 100 мл из матового стекла смешайте исследуемую пробу с 0,5 г диастазы и 0,25 г папаина. Добавьте максимум 15 мл дистиллированной воды 45-50°С. Хорошо перемешайте, чтобы получилась однородная суспензия. Закройте колбу крышкой и поставьте на 30 мин в печь при температуре 40°C.

Добавьте максимум 30 мл дистиллированной воды 45-50°С.

**6.7.2** Окисление

В мерную стеклянную колбу объемом 10 мл налейте пипеткой 5 мл раствора (6.7.2.1 или 6.7.2.2). Добавьте 3 мл основного раствора феррицианида калия (6.4.4.2). Перемешивайте в течение 2 минут. Добавьте 0,45 мл концентрированной фосфорной кислоты, перемешайте, охладите и доведите до полного объема дистиллированной водой. Немедленно хроматографируйте этот раствор.

**6.7.3** Условия
 ВЭЖХ

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка: | ODS или C 18,5 мкм; 250 X 4,6 мм или эквивалент |
| Инъекционная петля: | 50 мкл |
| Подвижная фаза: | см. пункт B.6.5.2 |
| Расход: | 1,5 мл/мин |
| \* Детектор: спектрофлуориметр, возбуждение: | 368 нм |
| Излучение: 440 Нм. |
| Регистратор: | 10 мм/мин |

\* Для определения витамина В2 его вводят непосредственно из фильтрата, при этом изменяется следующее условие:

Детектор: спектрофлуориметр; возбуждение: 450 Нм и излучение: 530 Нм

Сначала введите 50 мкл окисленного стандартного раствора (В.7.6.4) и определите время удержания: оно должно составлять около 5-6 мин. Затем введите 50 мкл полученного раствора B.7.7.3

**6.8** Расчет, выражение и интерпретация результатов

**6.8.1** Оценка

Определите пик тиохрома или рибофлавина на хроматограмме исследуемой пробы с помощью времени удержания, определенного хроматографией стандартного раствора. Измерьте высоту пиков, полученных с помощью хроматографии исследуемой пробы и стандартного раствора. Содержание витамина В1, выраженное в мг на 100 г продукта, равно:

hp x C x V x 100

hs x m x 1000

Где:

m = масса исследуемой пробы, в г

hp = высота пика экстракта, в мм

hs = высота пика стандартного раствора, в мм

C = концентрация стандартного раствора, в мкг/мл

V = объем в миллилитрах, в котором экстракт был разбавлен перед анализом с помощью ВЭЖХ (200 для этих продуктов)

**6.8.2** Повторяемость

Разница между двумя отдельными результатами, полученными с использованием одной и той же пробы для анализа, в одинаковых условиях (аналитик, аппарат, лаборатория) за короткий промежуток времени, не должна превышать 10% от среднего значения между обоими результатами.

**7 Определение ниацина Микробиологический метод**

**7.1** Основные принципы

Этот метод позволяет количественно определить неизвестные концентрации ниацина с использованием *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, микроорганизма, который не может синтезировать этот витамин, что напрямую связывает рост клеток с концентрацией ниацина. Для подготовки пробы и стандартной кривой используется среда, свободная от ниацина, и рост клеток количественно определяется турбидиметрически. По интерполяции на кривой определяется концентрация пробы.

**7.2** Реагенты и материалы

**7.2.1** Реагенты

Никотиновая кислота для биохимических целей. Дымящаяся соляная кислота 37% для анализа. Гидроксид натрия в чечевице для анализа. Кристаллы хлорида натрия для анализа.

**7.2.2** Материалы
Микропипетка.

Стаканы. Объемные пипетки. Колбы Эрленмейера. Объемные колбы. Пробирки для анализа.

**7.3** Приборы и инструменты
Автоклав.

Инкубатор при 35°C ± 1°C. Спектрофотометр.

Центрифуга.

**7.4** Штамм и культуральная среда
*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014.
Обезжиренное сухое молоко реактивного класса.
Бульон микропосевного материала.

Бактериологический агар. Бульон Bacto *Lactobacilli*. Тестовая среда для ниацина.

**7.4.1** Среда для поддержания штамма

Bacto Lactobacilli MRS-агар (MRS-агар)

Приготовьте 1 л среды с 55 г бульона Bacto Lactobacilli MRS + 15 г бактериологического агара согласно указанию этикетки бульона MRS + 1,5% обезжиренного молока (10% растворенные в дистиллированной воде). Разлейте по 6 мл в пробирки (желательно с завинчивающейся крышкой), стерилизуйте и охладите в вертикальном положении.

Храните в холодильнике при температуре 4°C.

**7.4.2** Поддержание штамма

Засевайте *Lactobacillus plantarum* глубоко в среду 7.4.1 каждые четыре недели, выполняйте промежуточное культивирование в течение 18 часов в жидкой среде 7.4.3. Подготовьте количество пробирок, необходимых для анализа, и сохраните не менее двух пробирок для поддержания штамма. Инкубируйте в течение 18 ч при 35°С.

**7.4.3** Культуральная среда для развития микроорганизма

Бульон *микропосевного* материала.

Приготовьте 1 л раствора в соответствии с указаниями на этикетке и разлейте по 10 мл в пробирки. Закройте пробирки колпачками и стерилизуйте в соответствии с указаниями производителя. Храните в холодильнике при температуре 4°C.

**7.5** Подготовка растворов

**7.5.1** Физиологический раствор

Разведите 9 г хлорида натрия в 1000 мл дистиллированной воды. Разлейте по 10 мл в пробирки, закройте колпачками и стерилизуйте в течение 15 мин при 121°С.

Храните в холодильнике при температуре 4°C.

**7.5.2** Раствор соляной кислоты прибл. 0,018 N.

В вытяжным шкафу разведите 82 мл 37%-ной соляной кислоты до объема 1000 мл дистиллированной водой. Для этого налейте кислоту в мерную колбу, которая уже содержит воду.

**7.5.3** Раствор гидроксида натрия 60 г/100 мл

Разведите 300 г гидроксида натрия в дистиллированной воде, охлаждая под проточной водой. Доведите до 500 мл в градуированной пробирке. Храните в банке с полиэтиленовой или резиновой пробкой.

**7.5.4** Раствор гидроксида натрия около 1 N

Разведите 20 г гидроксида натрия в дистиллированной воде и доведите до полного объема в мерной колбе объемом 500 мл с полиэтиленовой пробкой.

**7.5.5** Стандартный раствор

Непосредственно перед использованием взвесьте ровно 50,0 мг никотиновой кислоты; разведите в дистиллированной воде и доведите до полного объема в мерной колбе объемом 500 мл.

**7.6** Процедура

**7.6.1** Развитие микроорганизма

За день до анализа предварительно засейте его в 10 мл бульона микропосевного материала.

Инкубируйте в течение 18 ч при 35°С.

За шесть часов до засева для анализа засейте 2 капли (приблизительно 0,1 мл) последней 18-часовой культуры в другую 10-миллилитровую пробирку с бульоном микропосевного материала.

Инкубируйте в течение 6 ч при 35°С.

**7.6.2** Подготовка пробы к анализу

В колбе Эрленмейера объемом 150 мл взвесьте от 1 до 3 г однородной пробы, содержащей около 200 мкг витамина, добавьте 50 мл раствора соляной кислоты 1N небольшими количествами, держа колбу Эрленмейера под проточной горячей водой после каждого добавления.

Закройте колбу алюминиевой фольгой и поставьте в автоклав на 15 мин при 120°С. Охладите.

Отрегулируйте pH до 4,6, сначала добавив приблизительно 3 мл гидроксида натрия 60 г/100 мл при охлаждении колбы Эрленмейера, а затем гидроксид натрия 1 N. Перелейте в мерную колбу емкостью 100 мл и доведите до полного объема дистиллированной водой. Отфильтруйте через гофрированный фильтр со средней скоростью фильтрации.

Разбавьте фильтрат так, чтобы получился раствор около 0,05 мкг витамина на мл.

**7.6.3** Стандартный раствор 0,05 мкг/мл

Непосредственно перед использованием разбавьте раствор 7.5.5 следующим образом:

От 5 мл до 100 мл

От 10 мл до 100 мл

От 10 мл до 100 мл = 0,05 мкг/мл

**7.6.4** Культуральная среда для анализа

Тестовая среда для ниацина

Подготовьте необходимый объем в актиничной стеклянной колбе Эрленмейера объемом 100 мл. Действуйте в соответствии с указаниями на этикетке, нагревая раствор на решетке с магнитным перемешиванием.

Расчет необходимого объема:

стандарт: 30 пробирок 30 x 5 мл = 150 мл

каждый продукт: 10 пробирок 10 x 5 мл = 50 мл

 От 50 до 100 мл избытка

**7.6.5** Подготовка к анализу

**7.6.5.1** Стандартная серия

В металлическую подставку для пробирок поместите три ряда по 10 пробирок (180 x 18 мм), пронумерованных bl, 0, ..., 8; первая соответствует холостому опыту (bl).

С помощью пипетки налейте увеличенные объемы последнего разведения стандартного раствора в трех экземплярах в три ряда пробирок, доведите до 5 мл дистиллированной водой и с помощью бюретки или автоматического шприца добавьте 5 мл культуральной среды для анализа согласно следующей таблице:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Пробирка № | bl | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Раствор Стандартный | 0,0 | 0,0 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 2,5 | 3,0 |
| Вода | 5 | 5 | 4,75 | 4,5 | 4,25 | 4,0 | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 2,0 |
| Культуральная среда | 5 мл в каждой пробирке |

Пробирки холостого опыта (bl) не засеиваются.

**7.6.5.2** Серия продукта

На другой подставке поместите два ряда по 10 пробирок (180 x 18 мм). Первые пять пробирок в обоих рядах предназначены для одного продукта, остальные пять в обоих рядах-для другого продукта. Пронумеруйте пробирки от 9 до 13 и от 14 до 18 и так далее для всех проанализированных продуктов.

С помощью пипетки налейте увеличенные объемы последнего разведения раствора пробы в двух экземплярах в пять пробирок обоих рядов, доведите до 5 мл дистиллированной водой и добавьте 5 мл культуральной среды для анализа.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Пробирка № | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| Раствор пробы: | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1,0 | 1,5 |
| Вода | 4,75 | 4,5 | 4,25 | 4,0 | 3,5 |
| Культуральная среда | 5 мл в каждой пробирке |

Закройте пробирки колпачками или подходящей крышкой, закрывающей оба ряда пробирок на подставке.

**7.6.6** Стерилизация пробы

Стерилизуйте пробирки в течение 15 мин при 115°С, затем охладите их на бане с холодной водой.

**7.6.7** Засев

**7.6.7.1** Подготовка и стандартизация посевного материала

Непосредственно перед засевом анализа поместите достаточное количество культуры, приготовленной согласно 7.6.1, в стерильную пробирку центрифуги, центрифугируйте при 2600 об/мин в течение 5 минут, декантируйте и ресуспендируйте клеточный пакет в 10 мл физиологического раствора. Сделайте еще две промывки. Перенесите в кювету 1 см и выполните считывание на спектрофотометре при 575 нм. Стандартизируйте культуру, чтобы всегда получать примерно одинаковую экстинкцию. Не следует забывать вычитать из экстинкции культуры тестовую среду, которая является цветной средой.

В зависимости от экстинкции разведите n капель культуры (7.6.1) в пробирке, содержащей 10 мл среды (7.6.4). Эта пробирка и есть посевной материал.

Таким образом, для экстинкции культуры (7.6.1) от 0,2 до 0,4 (после вычитания экстинкции самой среды) введите от 4 до 8 капель культуры в пробирку, содержащую 10 мл среды (7.6.4). Если экстинкция не находится в указанном выше диапазоне, адаптируйте разведение следующим образом:

- экстинкция менее 0,2: добавьте в пробирку больше капель пропорционально среде (не более 10 капель).

- экстинкция более 0,4: добавьте меньше капель или разбавьте пропорционально среде (7.6.4).

**7.6.7.2** Засев

С помощью микропипетки со стерильным наконечником засейте 0,1 мл посевного материала в каждую пробирку стандартной серии и продукта. Пробирки холостого опыта (bl) не засеиваются.

После засева слегка встряхните пробирки для равномерного распределения микроорганизмов в среде.

**7.6.8** Инкубация

Инкубируйте засеянные пробирки в течение примерно 16 ч при 35°C. Регулярно наблюдайте за пробирками после 16 часов. Проверьте, достаточна ли разница в развитии микроорганизма между первым и последним разведением раствора.

При необходимости продлите инкубацию до достижения оптимального роста микроорганизма.

После инкубации рекомендуется прервать рост микроорганизма одновременно во всех пробирках, поместив их в баню с холодной водой.

**7.6.9** Показание

С помощью мешалки для пробирок перемешайте осадок, образовавшийся в результате развития микроорганизма. Перелейте суспензию в пробирку или оптическую кювету, в зависимости от фотометра. Измерьте коэффициент пропускания или поглощения при 575 Нм, установив 100% T или 0% А прибора с помощью холостого опыта (bl).\*

Встряхните и считайте пробирку за пробиркой, чтобы избежать оседания микроорганизмов.

\* Примечание: если определение производится по оптической плотности, ищите эквивалент значений в примерах, указанных в пропускании.

**7.7** Расчеты

**7.7.1** Кривая калибровки

Постройте кривую калибровки на миллиметровой бумаге или воспользуйтесь калькулятором линейной регрессии, взяв среднее значение каждой группы из трех пробирок по оси ординат, а мкг витамина - по оси абсцисс.

Пример:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Пробирка | мл | мкг | Показание | среднее |
|  |  |  | 1 | 2 | 3 |  |
| 0 | 0,0 | 0,0 | 88,7 | 88,6 | 88,2 | 88,5 |
| 1 | 0,25 | 0,0125 | 73,4 | 72,6 | 71,1 | 72,4 |
| 2 | 0,5 | 0,025 | 62,1 | 61,5 | 62,6 | 62,1 |
| 3 | 0,75 | 0,0375 | 53,3 | 53,2 | 55,5 | 54,0 |
| 4 | 1,0 | 0,050 | 47,3 | 48,0 | 49,1 | 48,1 |
| 5 | 1,5 | 0,075 | 36,8 | 37,7 | 40,5 | 38,3 |
| 6 | 2,0 | 0,10 | 31,0 | 45,6 | 39,5 | 35,3 |
| 7 | 2,5 | 0,125 | 30,5 | 27,2 | 27,2 | 28,3 |
| 8 | 3,0 | 0,15 | 29,0 | 24,8 | 24,0 | 25,9 |

Примечания:

Кривая калибровки характерна для каждого витамина. Тем лучше, чем большая часть занимает шкалу передачи.

Повторите анализ, если кривая роста развита плохо, это может быть связано со штаммом или культуральной средой для анализа; которые должны быть проверены отдельно.

**7.7.2** Содержание витамина в продукте

Среднее значение показаний каждой пары пробирок позволяет считывать количество витамина с кривой калибровки и рассчитывать его концентрацию при последнем разведении пробы.

Пример:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Пробирка | мл | Показание | среднее | мкг\* | мкг/мл |
|  |  | 1 | 2 |  |  |  |
| 9 | 0,25 | (88) | 79,0 | 79,0 | 0,0145 | 0,058 |
| 10 | 0,5 | 59,2 | 58,2 | 58,7 | 0,0300 | 0,060 |
| 11 | 0,75 | 52,0 | 52,2 | 52,1 | 0,0413 | 0,055 |
| 12 | 1,0 | 43,8 | 45,8 | 44,8 | 0,0580 | 0,058 |
| 13 | 1,5 | 35,0 | 35,5 | 35,3 | 0,086 | 0,057 |

Среднее значение 0,0576 (c)

() = аберрантное значение

\* = значения, считанные с кривой калибровки

Примечания:

Небольшие колебания значений в последнем столбце являются доказательством хорошего анализа.

Рассчитайте содержание витамина в мг/100 г продукта с учетом последовательных разведений и концентрации в разведенной пробе.

Содержание витамина, выраженное в мг никотиновой кислоты на 100 г продукта, равно:



Где:

C = среднее значение концентраций, считываемых с кривой калибровки, в мкг/мл

V1 = объем, в котором была растворена проба, в мл

V2 = аликвота V1 в мл

V3 = объем, до которого была разбавлена ​​аликвота V2, в мл

m = проба, в г

Пример:

Взвешивают 2,072 г (м) продукта в мерной колбе объемом 100 мл (V1). Отбирают аликвоту 2 мл (V2), которую разбавляют в мерной колбе объемом 100 мл (V3).

Среднее значение концентраций ниацина, считанных с кривой калибровки, составляет 0,0576 мкг/мл (С).

Содержание витамина:

0,0576 x 100 x 100 x 100 = 13,9 mg/100 g

2,072 x 2 x 1000

**8 Определение фолиевой кислоты Микробиологический метод.**

**8.1** Основные принципы

Этот метод позволяет количественно определять фолиевую кислоту с использованием *Lactobacillus casei* ATCC 7469, микроорганизма, который не может синтезировать этот витамин, что напрямую связывает рост клеток с концентрацией присутствующего фолата. Для подготовки пробы и стандартной кривой используется коммерческая среда, не содержащая фолиевой кислоты.

Рост клеток измеряют турбидиметрическим методом и путем интерполяции на кривой определяют концентрацию в пробе.

**8.2** Реагенты и материалы

**8.2.1** Реагенты

Растопленный или гранулированный хлорид кальция для анализа. Безводный двухкислотный фосфат калия. Безводный кислый фосфат калия. Гидроксид натрия в чечевице для анализа. Кристаллы хлорида натрия для анализа. Абсолютный этиловый спирт. α-амилаза. Лактоза.

**8.2.2** Материалы

Стеклянная колба Эрленмейера объемом 250 мл.

Стеклянная мерная колба объемом 100, 250 и 500 мл.

Стеклянные пробки.

Микропипетки.

Общий лабораторный материал.

Весь стеклянный материал должен быть актиничным или покрытым алюминиевой фольгой.

**8.3** Приборы и инструменты
Автоклав.

Инкубатор при 35°C ± 1°C.

Спектрофотометр.

Центрифуга.

**8.4** Штамм и культуральная среда
*Lactobacillus casei* ATCC 7469.

Обезжиренное сухое молоко реактивного класса.

Бульон микропосевного материала.

Бактериологический агар.

Бульон Bacto Lactobacilli MRS.

Тестовая среда для фолиевой кислоты.

**8.4.1** Среда для поддержания штамма.

Агар Bacto Lactobacilli MRS (MRS-агар).

Приготовьте 1 л среды с 55 г бульона Bacto Lactobacilli MRS + 15 г бактериологического агара согласно указанию этикетки бульона MRS + 1,5% обезжиренного молока (10% растворенные в дистиллированной воде). Разлейте по 6 мл в пробирки (желательно с завинчивающейся крышкой), стерилизуйте и охладите в вертикальном положении.

Храните в холодильнике при температуре 4°C.

**8.4.2** Поддержание штамма

Засевайте *Lactobacillus casei* глубоко в среду 8.4.1 каждые четыре недели, выполняйте промежуточное культивирование в течение 18 часов в жидкой среде 8.4.3. Подготовьте количество пробирок, необходимых для анализа, и сохраните не менее двух пробирок для поддержания штамма.

Инкубируйте в течение 18 ч при 35°С.

**8.4.3** Культуральная среда для развития микроорганизма

Бульон микропосевного материала

Приготовьте 1 л раствора в соответствии с указаниями на этикетке и разлейте по 10 мл в пробирки. Закройте пробирки колпачками и стерилизуйте в соответствии с указаниями производителя.

Храните в холодильнике при температуре 4°C.

**8.5** Подготовка растворов

**8.5.1** Физиологический раствор

Разведите 9 г хлорида натрия в 1000 мл дистиллированной воды. Разлейте по 10 мл в пробирки, закройте колпачками и стерилизуйте в течение 15 мин при 121°С.

Храните в холодильнике при температуре 4°C.

**8.5.2** Буферный раствор рН 6,1

Разведите 2 г гидроксида натрия в дистиллированной воде и доведите до полного объема в мерной колбе объемом 500 мл с полиэтиленовой пробкой.

**8.5.3** Раствор 2%-ного хлорида кальция, CaCl2

Разведите 2 г хлорида кальция в дистиллированной воде и доведите до 100 мл в мерной колбе.

**8.5.4** Стандартный раствор

Взвесьте ровно 50,0 мг фолиевой кислоты (птероилглутаминовой кислоты), разведите в дистиллированной воде в стеклянной мерной колбе объемом 500 мл, добавьте 50 мл NaOH 0,1 N, 100 мл спирта и доведите до полного объема дистиллированной водой.

Храните этот раствор при температуре 4°C максимум 6 месяцев.

**8.6** Процедура

Фолиевая кислота светочувствительна. Поэтому для всех растворов, содержащих такой витамин, следует использовать актиничный стеклянный материал или покрыть обычный стеклянный материал алюминиевой фольгой или черной тканью.

**8.6.1** Развитие микроорганизма

За день до анализа предварительно засейте его в 10 мл бульона микропосевного материала (8.4.3).

Инкубируйте в течение 18 ч при 35°С.

За шесть часов до засева для анализа засейте 2 капли (приблизительно 0,1 мл) последней 18-часовой культуры в другую 10-миллилитровую пробирку с бульоном микропосевного материала.

Инкубируйте в течение 6 ч при 35°С.

**8.6.2** Подготовка пробы к анализу

**8.6.2.1** Продукты, не содержащие крахмала

В колбе Эрленмейера объемом 250 мл взвесьте от 1 до 3 г однородной пробы, содержащей около 1 мкг фолиевой кислоты. Разведите в 30 мл буферного раствора рН 6,1 (8.5.2). Чтобы предотвратить образование комков, добавляйте буферный раствор в небольших количествах, держа колбу Эрленмейера под проточной горячей водой.

Закройте колбу алюминиевой фольгой и поставьте в автоклав на 20 мин при 102°С. Охладите.

Перелейте полученное количество в стеклянную мерную колбу объемом 100 мл. Добавьте к содержимому колбы 0,8 мл 2%-ного раствора хлорида кальция и перемешайте. Оставьте на 15 минут, затем доведите до полного объема дистиллированной водой. Отфильтруйте через гофрированный фильтр со средней скоростью фильтрации.

Разбавьте фильтрат так, чтобы получился раствор около 0,02 нг фолиевой кислоты на мл.

**8.6.2.2** Крахмалистые продукты

Действуйте в соответствии с первым подпунктом пункта 8.6.2.1.

Перед помещением раствора в автоклав добавьте 6%-ную смесь панкреатической α-амилазы в лактозу, соответствующую 1% пробы.

Инкубируйте в течение 30 мин при 42°С. Закройте колбу алюминиевой фольгой и поставьте в автоклав на 20 мин при 102°С. Охладите. Затем перелейте полученное количество в стеклянную мерную колбу объемом 100 мл и продолжите, как описано в 8.6.2.1

**Примечание:** С каждой новой партией диастазы проводите анализ холостого опыта.

Пипеткой наберите 10 мл стандартного раствора (8.6.3) разведения d. Добавьте 30 мл воды. Добавьте 100 мг 6%-ной смеси панкреатической α-амилазы в лактозу. Инкубируйте в течение 30 мин при 42°С. Перелейте полученное количество в мерную колбу объемом 100 мл. Доведите до полного объема и отфильтруйте.

Кривая калибровки, полученная для этого раствора, должна быть сопоставима с кривой, полученной для необработанного стандартного раствора.

**8.6.3** Стандартный раствор 0,02 нг/мл

Непосредственно перед использованием разбавьте раствор 8.5.4 следующим образом:

От 10 мл до 100 мл

От 10 мл до 100 мл

От 2 мл до 100 мл

От 10 мл до 100 мл

От 10 мл до 100 мл = 0,2 нг/мл

**8.6.4** Культуральная среда для анализа

Средство для тестирования на фолиевую кислоту.

Подготовьте необходимый объем в стеклянной колбе Эрленмейера объемом 1000 мл. Действуйте в соответствии с указаниями на этикетке, нагревая раствор на решетке с магнитным перемешиванием.

Расчет необходимого объема:

стандарт: 30 пробирок 30 x 5 мл = 150 мл

каждый продукт: 10 пробирок 10 x 5 мл = 50 мл

+ 50 мл до 100 мл избытка

**8.6.5** Подготовка к анализу

**8.6.5.1** Стандартная серия

В металлическую подставку для пробирок поместите три ряда по 10 пробирок (180 x 18 мм), пронумерованных bl, 0, ..., 8; первая соответствует холостому опыту.

С помощью пипетки налейте увеличенные объемы последнего разведения стандартного раствора в трех экземплярах в три ряда пробирок, доведите до 5 мл дистиллированной водой и с помощью бюретки или автоматического шприца добавьте 5 мл культуральной среды для анализа согласно следующей таблице:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Пробирка №: bl | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Раствор Стандарт: 0,0 | 0,0 | 0,25 | 0,50 | 0,75 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 2,5 | 3,0 мл |
| Вода: 5 | 5,0 | 4,75 | 4,5 | 4,25 | 4,0 | 3,5 | 3,0 | 2,5 | 2,0 |
| Культуральная среда | 5 мл в каждой пробирке |

Пробирки холостого опыта (bl) не засеиваются.

**8.6.5.2** Серия продукта

На другой подставке поместите два ряда по 10 пробирок (180 x 18 мм). Первые пять пробирок в обоих рядах предназначены для одного продукта, остальные пять в обоих рядах-для другого продукта. Пронумеруйте от 9 до 13 пробирки и от 14 до 18 и так далее для всех проанализированных продуктов.

С помощью пипетки налейте увеличенные объемы последнего разведения раствора пробы в двух экземплярах в пять пробирок обоих рядов, доведите до 5 мл дистиллированной водой и добавьте 5 мл культуральной среды для анализа.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Пробирка № 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| Раствор пробы: 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1,0 | 1,5 мл |
| Вода: 4,75 | 4,5 | 4,25 | 4,0 | 3,5 |
| Культуральная среда | 5 мл в каждой пробирке |

Закройте пробирки колпачками или подходящей крышкой, закрывающей оба ряда пробирок на подставке.

**8.6.6** Стерилизация пробы

Стерилизуйте пробирки в течение 10 мин при 121°С, затем охладите их на бане с холодной водой.

**8.6.7** Засев

**8.6.7.1** Подготовка и стандартизация посевного материала

Непосредственно перед засевом анализа поместите достаточное количество культуры, приготовленной согласно 8.6.1, в стерильную пробирку центрифуги, центрифугируйте при 2600 об/мин в течение 5 минут, декантируйте и ресуспендируйте клеточный пакет в 10 мл физиологического раствора. Сделайте еще две промывки. Перенесите в кювету 1 см и выполните считывание на спектрофотометре при 575 нм. Стандартизируйте культуру, чтобы всегда получать примерно одинаковую экстинкцию. Не следует забывать вычитать из экстинкции культуры тестовую среду, которая является цветной средой.

В зависимости от экстинкции разведите n капель культуры (В.8.6.1) в пробирке, содержащей 10 мл среды (8.6.4). Эта пробирка и есть посевной материал.

Таким образом, для экстинкции культуры (8.6.1) от 0,40 до 0,60 (после вычитания экстинкции самой среды) введите 5 капель культуры в пробирку, содержащую 10 мл среды (8.6.4). Если экстинкция не находится в указанном выше диапазоне, адаптируйте разведение следующим образом:

- экстинкция менее 0,40: добавьте в пробирку больше капель пропорционально среде (не более 10 капель).

- экстинкция более 0,60: добавьте меньше капель или разбавьте пропорционально среде (7.6.4).

**8.6.7.2** Засев

С помощью микропипетки со стерильным наконечником засейте 0,1 мл посевного материала в каждую пробирку стандартной серии и продукта. Пробирки холостого опыта (bl) не засеиваются.

После засева слегка встряхните пробирки для равномерного распределения микроорганизмов в среде.

**8.6.8** Инкубация

Инкубируйте засеянные пробирки в течение примерно 19 ч при 35°C. Регулярно наблюдайте за пробирками после 19 часов. Проверьте, достаточна ли разница в развитии микроорганизма между первым и последним разведением раствора.

При необходимости продлите инкубацию до достижения оптимального роста микроорганизма.

После инкубации рекомендуется прервать рост микроорганизма одновременно во всех пробирках, поместив их в баню с холодной водой.

**8.6.9** Показание

С помощью мешалки для пробирок перемешайте осадок, образовавшийся в результате развития микроорганизма. Перелейте суспензию в пробирку или оптическую кювету, в зависимости от фотометра. Измерьте коэффициент пропускания или поглощения при 575 Нм, установив 100% T или 0% А прибора с помощью холостого опыта (bl).

Встряхните и считайте пробирку за пробиркой, чтобы избежать оседания микроорганизмов.

**8.7** Расчеты

**8.7.1** Кривая калибровки

Постройте кривую калибровки на миллиметровой бумаге или воспользуйтесь калькулятором линейной регрессии, взяв среднее значение каждой группы из трех пробирок по оси ординат, а нг фолиевой кислоты - по оси абсцисс.

\* Примечание: если определение производится по оптической плотности, ищите эквивалент значений в примерах, указанных в пропускании.

Пример:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Пробирка | мл | нг | Показание | среднее |
|  |  |  | 1 | 2 | 3 |  |
| 0 | 0,0 | 0,0 | 88,1 | 87,6 | 87,5 | 87,7 |
| 1 | 0,25 | 0,05 | 78,4 | 78,5 | 79,5 | 78,8 |
| 2 | 0,50 | 0,1 | 70,5 | 70,4 | 71,3 | 70,7 |
| 3 | 0,75 | 0,15 | 64,1 | 64,6 | 64,6 | 64,4 |
| 4 | 1,0 | 0,2 | 58,9 | 59,6 | 59,3 | 59,3 |
| 5 | 1,5 | 0,3 | 50,8 | 51,3 | 51,4 | 51,2 |
| 6 | 2,0 | 0,4 | 44,7 | 44,1 | 45,5 | 44,8 |
| 7 | 2,5 | 0,5 | 39,7 | 39,7 | 38,2 | 39,2 |
| 8 | 3,0 | 0,6 | 35,6 | 36,1 | 35,2 | 35,6 |

Примечания:

Кривая калибровки характерна для каждого витамина. Тем лучше, чем большая часть занимает шкалу передачи.

Повторите анализ, если кривая роста развита плохо, это может быть связано со штаммом или культуральной средой для анализа; которые должны быть проверены отдельно.

**8.7.2** Содержание витамина в продукте

Среднее значение показаний каждой пары пробирок позволяет считывать количество витамина с кривой калибровки и рассчитывать его концентрацию при последнем разведении пробы.

Пример:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Пробирка | мл | Показание | среднее | нг\* | Нг/мл |
|  |  | 1 | 2 |  |  |  |
| 9 | 0,25 | 80,2 | 79,4 | 79,8 | 0,045 | 0,18 |
| 10 | 0,50 | 71,6 | 73,7 | 72,6 | 0,095 | 0,19 |
| 11 | 0,75 | 66,1 | 67,7 | 66,9 | 0,135 | 0,18 |
| 12 | 1,0 | 61,4 | (56,5) | 61,4 | 0,185 | 0,185 |
| 13 | 1,5 | 53,7 | 52,1 | 52,9 | 0,280 | 0,187 |

() = аберрантное значение

\* = значения, считанные с кривой калибровки

Примечания:

Небольшие колебания значений в последнем столбце являются доказательством хорошего анализа.

Рассчитайте содержание витамина в мкг/100 г продукта с учетом последовательных разведений и концентрации в разведенной пробе.

Содержание фолиевой кислоты, выраженное в мкг/100 г продукта, равно:



C= среднее значение концентраций, считываемых с кривой калибровки в нг/мл, V1= объем, в котором была растворена проба, в мл

V2 = аликвота V1 в мл

V3 = объем, до которого была разбавлена ​​аликвота V2, в мл

m = проба, в г

Пример:

Взвешивают 1 г (м) продукта в мерной колбе объемом 100 мл (V1). Отбирают аликвоту 10 мл (V2), которую разбавляют в мерной колбе объемом 250 мл (V3).

Среднее значение концентраций фолиевой кислоты, считанных с кривой калибровки, составляет 0,184 нг/мл (С).

Содержание фолиевой кислоты:

0,184 x 250 x 100 x 100 = 46 мкг /100 г

1 x 10 x 1000