МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО ОБНАРУЖЕНИЮ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В ЗЕРНЕ И ЗЕРНОПРОДУКТАХ

МОСКВА - 1986г.

gost.e-ecolog.ru

Методические указания разработаны в Институте питания АМН СССР (рук.лаборатории гигиенических исследований импортируемых пищевых продуктов кандидат химических наук К.И.Эллер, ст.научный сотрудник,кандидат медицинских наук Л.Г.Левин, младший научный сотрудник В.В.Пименова, ст.лаборант Н.И.Музыченко).

Предназначены для использования лабораториями санитарно-эпидемиологических станций и институтами при контроле за загрязнением зерна и зернопродуктов мочевой кислотой.

"УТВЕРЖДАЮ"
Главный государственный
санитарный врач СССР

_____ П.Н. Бургасов

II февраля 1986 г.
№ 4072-86

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОБНАРУЖЕНИЮ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ И ЗЕРНЕ И ЗЕРНОПРОДУКТАХ

Мочевая кислота - естественный продукт обмена нуклеиновых кислот у человека, животных и насекомых. Наличие мочевой кислоты в зерне и зернопродуктах рассматривается как один из показателей их загрязненности продуктами жизнедеятельности насекомых.

Мочевая кислота (2,6,7-тригидроксипурин), $C_5H_4O_3N_4$, молекулярная масса I68.I2, представляет собой бесцветное кристаллическое вещество, малорастворимое в воде (6,45 мг/I00мл при 37°С; 80 мг/I00 мл при I00°С), нерастворимое в спирте и эфире, легко растворимое в щелочах. Максимум поглощения УФ-света при длине волны 282 нм.

В основе предлагаемого метода анализа мочевой кислоты лежит прямое определение с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Предел обнаружения метода - 0,I мг%, относительное стандартное отклонение 0,07 - 0,I0. Степень извлечения добавленной к образцу мочевой кислоты 90-92%. Продолжительность анализа -45 мин.

Метод включает следующие этапы:

- экстракцию образца кипящей водой,

- разделение, идентификацию и определение содержания мочевой кислоты с помощью ВЭЖХ на силикагеле, химически связанном с октадецилсиланом с УФ-детектором при длине волны 282 нм.

Методические указания предназначены для лабораторий санитарно-эпидемиологических станций и научно-исследовательских институтов при контроле за загрязнением зерна и зернопродуктов мочевой кислотой.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

I. Жидкостный хроматограф "Альтекс", модель 336 или другой хроматограф с аналогичными параметрами, колонка и предколонка с силикагелем типа "Ультрасфера ОДС" с размером частиц 5 мкм, длина колонки 25 см, предколонки - 4,5 см, внутренний диаметр - 0,46 см; ультрафиолетовый детектор "Кратос", модель SF-757 или другой детектор с аналогичными параметрами.

2. Микрошприц МШ-IO на IOмкл.

3. Колбы плоскодонные конические на 500 мл с НШ 29, тип КнКШ 250-29/32 по ГОСТ I0394-74.

4. Цилиндры мерные на 500 мл, тип 2-I00 по ГОСТ I770-74.

5. Мочевая кислота

6. Кислота уксусная "хч" по ГОСТ 6I-75

7. Натрий уксуснокислый (натрия ацетат), 3-водный "хч" по ГОСТ I99-78.

I. ЭКСТРАКЦИЯ

При отборе пробы для анализа следует руководствоваться требованиями ГОСТа I2430-66 "Сельскохозяйственная продукция. Методы отбора образцов при карантинном досмотре и экспертизе". Навеску отобранной пробы (IOг) помещают в плоскодонную коническую колбу на 500 мл, добавляют 300 мл дистиллированной воды и нагревают при кипении в течение IO минут. После охлаждения до 25°С экстракт фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

2. ОБНАРУЖЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ

2.I. Приготовление стандартного раствора мочевой кислоты.

Стандартный раствор мочевой кислоты готовят следующим образом: навеску 2 мг кристаллической мочевой кислоты помещают в мерную колбу на I00 мл, растворяют в воде и доводят водой до метки. Концентрация мочевой кислоты в полученном стандартном растворе 20 мкг/мл или

20 нг/мкл.

Рабочий раствор мочевой кислоты для ВЭЖХ готовят следующим образом: 2,5 мл стандартного раствора мочевой кислоты с концентрацией 20 нг/мкл помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят водой до метки. Концентрация мочевой кислоты в полученном растворе 2 нг/мкл.

Стандартные растворы хранят в холодильнике при температуре +5 - +10°С. Срок годности стандартного раствора до I года.

2.2. Приготовление подвижной фазы для ВЭЖХ.

В мерную колбу на 500 мл добавляют 4,2 мл уксусной кислоты и I3,4 мг уксуснокислого натрия 3-водного, объем доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают. 34,6 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 500 мл и объем доводят дистиллированной водой до метки. Полученный раствор подвижной фазы (ацетатный буфер) должен иметь pH 5,8. При необходимости pH раствора доводят до pH 5,8 добавлением IM раствора уксусной кислоты с использованием для контроля pH-метра. Подвижную фазу следует фильтровать через бумажный фильтр перед проведением ВЭЖХ.

2.3. Проведение ВЭЖХ.

Условия ВЭЖХ: колонка и предколонка "Ультрасфера ОДС", подвижная фаза 0,04 М водный раствор ацетатного буфера, pH 5,8, скорость подвижной фазы I мл/мин., УФ детектор, длина волны 282 нм, шкала чувствительности - 0,0I или 0,005 единиц оптической плотности.

Для калибровки прибора в хроматограф вводят I,3,6 мкл стандартного раствора, что соответствует 2,6,I2 нг мочевой кислоты. Для каждого количества стандарта определяют высоту пика на хроматограмме. При описанных выше условиях ВЭЖХ время выхода пика мочевой кислоты составляет 9 - I0 минут.

В инжектор хроматографа вводят 5 - 20 мкл экстракта.

При наличии пика на хроматограмме анализируемого экстракта, совпадающего по времени выхода со стандартом, определяют его высоту ($h_{обр.}$).

Расчет концентрации мочевой кислоты в образце проводят по формуле:

$$C = \frac{V_I \times m \times h_{обр.}}{V_2 \times 100 \times h_{ст.}} \text{ мг\%}, \quad \text{где}$$

V_I – объем экстракта, мл (300 мл),
V_2 – объем экстракта, введенный в хроматограф, мкл (5-20 мкл),
m – масса стандарта мочевой кислоты, введенной в хроматограф, нг,
$h_{ст}$ – высота пика, соответствующая данной массе стандарта, мм,
$h_{обр.}$ – высота пика мочевой кислоты из образца, мм,

Если пик мочевой кислоты в образце выходит за предел шкалы самописца, анализ проводят повторно после разбавления раствора экстракта водой, т.е. после увеличения объема V_I.

Перепечатка

Зак. 4594 Тип. МЗ РСФСР Тир. 200

gost.e-ecolog.ru