Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение домоевой кислоты в морепродуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2229—07

gost.e-ecolog.ru

Определение домоевой кислоты в морепродуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.—11 с.

1. Методические указания разработаны ГУ НИИ питания РАМН (В. А.Тутельян, С. А. Хотимченко, Ю. А. Коханова, Т. В. Киселева, К. И. Эллер).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Роспотребнадзора (протокол № 2 от 21 июня 2007 г.).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 17 июля 2007 г.

4. Введены в действие 1 ноября 2007 г.

5. Введены впервые.

© Роспотребнадзор, 2008
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008

Содержание

1. Назначение и область применения 4
2. Общие положения 4
3. Отбор и подготовка проб 6
4. Принцип метода 6
5. Аппаратура, материалы, реактивы 6
6. Требования техники безопасности при проведении испытаний 7
7. Подготовка к испытанию 8
7.1. Приготовление реактивов 8
7.1.1. Приготовление мобильной фазы для ВЭЖХ 8
7.1.2. Приготовление калибровочных растворов 8
7.1.3. Приготовление рабочих растворов 8
8. Проведение испытания методом ВЭЖХ 9
8.1. Подготовка образца для определения домоевой кисллоты 9
9. Условия хроматографирования (ВЭЖХ) 10
10. Построение калибровочной кривой 10
11. Обработка результатов 11

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
17 июля 2007 г.
Дата введения: 1 ноября 2007 г.

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение домоевой кислоты в морепродуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.2229—07

1. Назначение и область применения

1.1. Настоящие методические указания устанавливают метод определения домоевой кислоты в морепродуктах на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии.

1.2. Методические указания предназначены для органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляющих контроль качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, а также могут быть использованы для производственного контроля другими испытательными лабораториями, аккредитованными в порядке, установленном Правительством Российской Федерации.

2. Общие положения

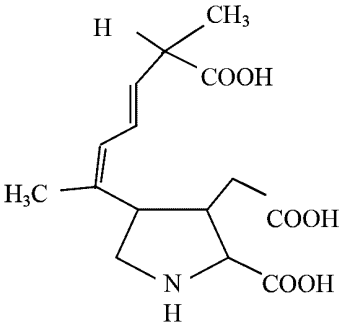
2.1. Представителем группы фикотоксинов является домоевая кислота (амнестический яд моллюсков). Основным продуцентом токсина являются диатомовые микроводоросли рода Pseudo-nitzschia. В зависимости от количества токсина, поступившего в организм, клиническая картина отравления может варьировать от гастроинтестинальных симптомов (тошнота, рвота, диарея, боли в животе) и неврологической симптоматики (сильные головные боли, головокружение и т. д.) до перма-

нентной потери краткосрочной памяти и летального исхода. Воздействуя на глютаматные рецепторы нервной системы, токсин вызывает нейрональную дегенерацию, а морфологические изменения тканей характеризуются некрозом глубинных структур мозга (гиппокамп, миндалевидное ядро, таламус).

2.2. В настоящее время во многих странах норматив содержания токсина в двустворчатых моллюсках определен на уровне не более 20 мкг/г ткани моллюска. Содержание домоевой кислоты в крабах нормируется только для внутренних органов (не более 30 мг/кг). Известно, что распространение домоевой кислоты по пищевой цепи затрагивает и другие морские организмы, в том числе ракообразных, головоногих моллюсков, рыб и даже млекопитающих (киты, морские львы, тюлени). Таким образом, источником поступления токсина в организм человека является потребление морепродуктов.

2.3. В связи с тем, что при попадании в организм небольшого количества токсина отмечаются только неспецифические гастроинтестинальные симптомы, возможна гиподиагностика данного отравления. Это определяет необходимость разработки доступных и надежных методов обнаружения и количественного определения домоевой кислоты, что позволит проводить надзор за содержанием этого вещества в морепродуктах и оценить риск его влияния на здоровье населения.

Структурная формула:



Эмпирическая формула: $C_{15}H_{21}NO_6$.

Молекулярная масса: 311,14.

Количественный метод определения домоевой кислоты в морепродуктах при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии отличается низким пределом обнаружения (0,5 мкг/г), хорошей воспро-

изводимостью и надежностью (табл. 1 в разделе 11). Диапазон определяемых концентраций составляет 0,5—200 мкг/г. Относительная погрешность измерений составляет 25 %.

3. Отбор и подготовка проб

Отбор морепродуктов осуществляется в соответствии с требованиями ГОСТ 7631 «Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Правила приемки, органолептические методы оценки качества, методы отбора проб для лабораторных испытаний».

Отобранные образцы морепродуктов герметично упаковывают в полиэтиленовые мешки либо стеклянные банки с притертыми крышками. Образцы доставляют в лабораторию для анализа сразу же после отбора проб или, в случае необходимости, замораживают и хранят при температуре не менее – 10 °С, используя для этой цели морозильники или соответствующие приспособления.

После извлечения тела моллюска из раковины его необходимо обсушить для удаления соленой воды. Измельчить образцы в приборе для грубого измельчения. Подготовка образцов из этого гомогената может быть произведена либо немедленно после измельчения, либо позднее после повторного перемешивания. Гомогенат может храниться не более месяца при температуре –10…–20 °С, в плотно закрытой емкости.

4. Принцип метода

Метод основан на экстракции домоевой кислоты из гомогенизированных тканей морепродуктов водным раствором метанола (1 : 1, v/v). Количество токсина определяется при помощи ВЭЖХ с УФ-детектором в обращенно-фазном варианте.

5. Аппаратура, материалы, реактивы

Жидкостный хроматограф с УФ-детектором (любой марки), длина волны 242 нм.

Колонка с обращенной фазой (С18) (Vydac 201TP, Supelco LC-PAH) или эквивалентная, длина 25 см, диаметр 4,6 мм, диаметр сорбента 5 мкм.

Прибор для грубого измельчения тканей (блендер).

Гомогенизатор лабораторный.

Центрифуга любого типа, обеспечивающая 4 000 об./мин.

pH-метр.

Весы аналитические по ГОСТ 24104.
Цилиндры мерные объемом 100, 200, 500 $см^3$ по ГОСТ 1770.
Колбы мерные на 25 $см^3$ по ГОСТ 1770.
Колбы мерные на 500 $см^3$ по ГОСТ 1770.
Колбы конические на шлифе 500 $см^3$ ГОСТ 25336.
Пипетки 2,0; 5,0 и 10,0 $см^3$ по ГОСТ 29227.
Одноканальные автоматические пипетки переменного объема 100—1000 $мм^3$.
Одноканальные автоматические пипетки переменного объема 1,0—5,0 $см^3$.
Пробирки центрифужные 10 $см^3$по ГОСТ 1770.
Воронки стеклянные по ГОСТ 25336.
Фильтры метанол-совместимые с диаметром пор 0,45 мкм (Macherey-Nagel), либо аналогичные.
Система для твердофазной экстракции (Macherey-Nagel, Supelco), либо аналогичная.
Патроны для твердофазной экстракции вместимостью 3 $см^3$, содержащие 500 мг силикагеля с закрепленными четвертичными аммониевыми группами (JT Baker Scientific, Supelco), либо аналогичные.
Виалы темные с винтовой крышкой объемом 2 $см^3$ (Supelco), либо аналогичные.
Стекла часовые по ГОСТ 14183.
Ацетонитрил по ТУ 6-09-3534.
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.
Метанол (спирт метиловый) по ГОСТ 6995.
Трифторуксусная кислота (спектрофотометрического качества), хч.
Лимонная кислота (моногидрат), хч, по ГОСТ 3652.
Натрий лимоннокислый трехзамещенный 2-водный, хч.
Аммиак водный, хч, по ГОСТ 3760.
Домоевая кислота-стандарт, импорт.

6. Требования техники безопасности при проведении испытаний

Помещение, в котором проводится определение домоевой кислоты, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией. Все операции анализа необходимо проводить в вытяжном шкафу с использованием индивидуальных средств защиты.

7. Подготовка к испытанию

7.1. Приготовление реактивов

7.1.1. Приготовление мобильной фазы для ВЭЖХ

Подкислить воду трифторуксусной кислотой до значения pH 2,5.
Градиентная мобильная фаза для ВЭЖХ:

Время (мин)	Соотношение компонентов мобильной фазы		
	вода	ацетонитрил	метиловый спирт
0,0	89	10	1
15,0	85	14	1
20,0	89	10	1
25,0	89	10	1

7.1.2. Приготовление калибровочных растворов

Стандарт домоевой кислоты (5 мг) аккуратно растворить в мерной колбе на 25 $см^3$ в растворе (ацетонитрил : вода – 1 : 9) и довести до метки для получения стандартного раствора 200 мкг/ $см^3$ (стандартный раствор 1).

Пипеткой отобрать 2 $см^3$ стандартного раствора 1, внести его в мерную колбу и довести до 25 $см^3$ раствором (ацетонитрил : вода – 1 : 9) для получения стандартного раствора 16 мкг/ $см^3$.

Повторить эту процедуру еще два раза для получения стандартных растворов с концентрацией 1,28 и 0,1024 мкг/$см^3$. Калибровочная кривая представлена на рис. 1 (раздел 10).

Хранить не более 1 года при температуре – 12 °С в темноте. Заморозить неиспользованные растворы. При повторном использовании довести до комнатной температуры.

7.1.3. Приготовление рабочих растворов

- раствор для экстракции: смешать равные количества перегнанного метанола и воды (из расчета 6 $см^3$ метанола и 6 $см^3$ воды на 1 образец (3,0 г ткани),
- раствор для патронов твердофазной экстракции и промывания петли: смешать ацетонитрил и воду (ацетонитрил : вода – 1 : 9),
- цитратный буфер (0,5 М, pH 3,2): растворить 52,55 г моногидрата лимонной кислоты в 400 $см^3$ дистиллированной воды. Довести pH раствора до значения 3,2 концентрированным раствором аммиака водного.

Добавить 50 см^3 ацетонитрила и довести до 500 см^3 дистиллированной водой.

Также этот буфер может быть приготовлен следующим образом: растворить 40,4 г моногидрата лимонной кислоты и натрий лимоннокислый трехзамещенный 2-водный (17,0 г) в 400 см^3 дистиллированной воды, добавить 50 см^3 ацетонитрила и довести до 500 см^3 дистиллированной водой.

8. Проведение испытания методом ВЭЖХ

8.1. Подготовка образца для определения домоевой кисллоты

Экстракция: взвешивают 3,0 г измельченной ткани моллюсков. Добавляют 12,0 см^3 экстракционного растворителя (метанол : вода – 1 : 1) и гомогенизируют 3 мин при 2 000 rpm. Обязательна тщательная промывка гомогенизатора для предупреждения смешивания образцов. Центрифугируют при 4 000 об./мин в течение 10 мин. Отфильтровывают 5—10 см^3 надосадочной жидкости через сухой метанол-совместимый фильтр (0,45 мкм) в сосуд с завинчивающейся крышкой (виалу) и плотно закупоривают. Экстракт необходимо использовать в течение 2—3 ч, в противном случае, хранить при температуре –10…–20 °С, в плотно закрытой емкости.

Образцы экстрактов вводятся в систему либо непосредственно после фильтрации неочищенного экстракта, либо очищения его на патронах твердофазной экстракции. Это обеспечивает выделение домоевой кислоты и родственных компонентов из экстракта.

Условия для патрона для твердофазной экстракции: пропускают 6 см^3 метанола, затем 3 см^3 воды и 3 см^3 экстрагирующего раствора (метанол : вода – 1 : 1) через патрон перед его использованием, либо проверкой. Патрон не должен высыхать ни на каком этапе процедуры.

Очистка на патроне твердофазной экстракции: помещают 2,0 см^3 отфильтрованной надосадочной жидкости на поверхность патрона и дают медленно стекать (1 капля/с). Останавливают ток, как только мениск образца достигнет верхней точки упаковки патрона. Промывают патрон (1 капля/с) 2 см^3 раствора для промывания (ацетонитрил : вода – 1 : 9). Останавливают ток, как только мениск образца достигнет верхней точки упаковки патрона. Добавляют 0,5 см^3 цитратного буферного элюента и осторожно позволяют стекать до момента, пока мениск образца не достигнет верхней точки упаковки патрона. Помещают виалу для

сбора элюата под патрон. Элюируют домоевую кислоту 2 см^3 цитратного буфера.

Перед отбором аликвоты полученный раствор размешать. Образцы должны быть использованы как можно быстрее, либо храниться в тщательно закрытой емкости в холодильнике, не замораживая, в течение 1 недели.

9. Условия хроматографирования (ВЭЖХ)

В жидкостной хроматограф с колонкой (ODS, C_{18}) 5 мкм (250 х 4,6 мм), УФ-детектором при λ = 242 нм, температура колонки 40 °С; скорость потока мобильной фазы 1,0—1,5 см^3/мин; петля 20 мм^3, используя градиент мобильной фазы вода-ацетонитрил-метанол (см. п. 7.1.1) вводят 20 мм^3 стандартного раствора домоевой кислоты. В тех же условиях вводят экстракт образца (морепродукта).

10. Построение калибровочной кривой

На рис. 1 представлена градуировочная характеристика, выражающая зависимость площади хроматографического пика от концентрации домоевой кислоты в растворе.

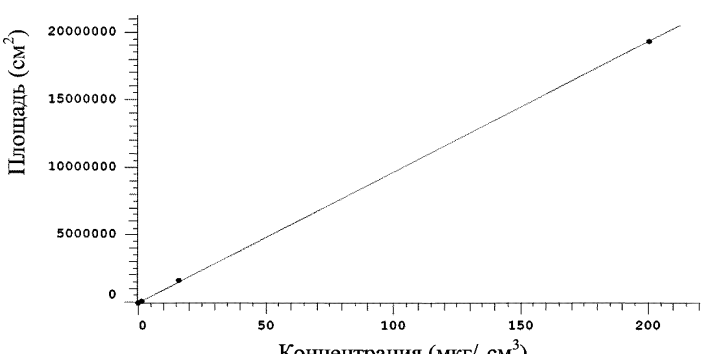


Рис. 1. Зависимость площади хроматографического пика от концентрации домоевой кислоты в растворе

11. Обработка результатов

11.1. За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Окончательный результат округляют до второго десятичного знака.

Содержание домоевой кислоты в пробе рассчитывают по формуле:

$$X = S_{обр.}/S_{ст.} \cdot C_{ст.}/M \cdot V, \text{ где}$$

X – содержание домоевой кислоты в пробе, мкг/г;

$S_{обр.}$ – площадь пика образца, см^2;

$S_{ст.}$ – площадь пика стандарта, см^2;

$C_{ст.}$ – концентрация стандарта, мкг/см^3;

M – навеска образца, г;

V – конечный объем разведенной пробы, см^3.

Таблица 1

Метрологические характеристики метода определения домоевой кислоты

Статистический параметр	Значения
Нижний предел определения, мкг/г	0,5
Интервал надежного определения, мкг/г	0,5—200,0
Среднее значение открываемости (показатель правильности), %	80
Допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений ДК, полученными в одной лаборатории в одной серии измерений (сходимость), при P = 0,95 %, не должно превышать, %	7,0
Допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений ДК, выполненных в двух разных лабораториях (воспроизводимость), при P = 0,95 % не должно превышать по отношению к среднему, %	10

11.2. Если расхождение результатов двух параллельных определений (сходимость и воспроизводимость) превышает требования, указанные в таблице, то повторно проводят два новых параллельных определения.

gost.e-ecolog.ru