ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РОССИЙСКИЙ РЕСПУБЛИКАНСКИЙ
ИНФОРМАЦИОННО-АНАЛИТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ЧУЖЕРОДНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

(Сборник нормативных материалов)

Москва, 1994 г.

gost.e-ecolog.ru

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РОССИЙСКИЙ РЕСПУБЛИКАНСКИЙ
ИНФОРМАЦИОННО-АНАЛИТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ЧУЖЕРОДНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

(Сборник нормативных материалов)

Москва, 1994 г.

ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение пищевых продуктов токсичными чужеродными веществами является частью глобальной проблемы загрязнения окружающей среды, поэтому в настоящее время очень важным аспектом является определение микропримесей загрязняющих веществ в продуктах питания и снижение их содержания. В последние годы все больший приоритет приобретают исследования по определению таких токсикантов как различные микотоксины (афлатоксины, патулин, зеараленон, вомитоксин, трихотецены и др.), соли тяжелых металлов, нитриты, нитраты, N-нитрозамины и др.

Настоящий сборник включает в себя ранее изданные Методические указания по определению наиболее приоритетных загрязнителей пищевых продуктов, разработанные научно-исследовательскими институтами медицинского профиля и утвержденные Главным санитарно-эпидемиологическим управлением Минздрава СССР и ГКСЭН РФ.

В соответствии с Постановлением Госкомсанэпиднадзора Российской Федерации от 06.02.92 г. № 1 «О порядке действия на территории Российской Федерации нормативных актов бывшего Союза ССР в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения» на всей территории Российской Федерации действуют общесоюзные санитарные правила и нормативные акты впредь до принятия соответствующих нормативных актов Российской Федерации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Сборник предназначен для санитарно-гигиенических лабораторий центров Госсанэпиднадзора, НИИ и учреждений гигиенического профиля, кафедр гигиены питания медицинских институтов и институтов усовершенствования врачей, а также может быть использован лабораториями других организаций, занимающихся исследованиями пищевых продуктов.

Будем признательны за все критические замечания и пожелания, направленные на улучшение данного Сборника или составление аналогичных Сборников по другим разделам исследований пищевых продуктов.

Л. Г. Подунова

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ Т-2 ТОКСИНА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ*

Оборудование и материалы

1. Аппарат для встряхивания проб типа АВУ-6С по ТУ 64-1-2451-78.

2. Ротационный испаритель с ловушкой по ТУ 25-11-917-76 (завод «Химлабприбор»).

3. Кофемолка ЭКМ-ЗУ.

4. Хроматограф газовый серии «Цвет-100» с детектором постоянной скорости рекомбинации (ДЭЗ); колонка стеклянная 1 м × 0,4 см с жидкой фазой OV-1 или OV-101 на Хроматоне N-супер («Лахема», ЧССР); в качестве самописца — регистрирующий потенциометр КСП-4 модификации 41.130.90.909 или 41.140.90.910 с диапазоном измерений 1 мВ; газ — носитель и продувочный газ — азот особой чистоты.

5. Прибор для флуоресцентного анализа витаминов в растворе (модель 833) ТУ 64-1-1080-78 или диагностическая лампа ОЛД-41.

6. Магнитная мешалка любого типа.

7. Микрошприц МШ-10 на 10 мкл, микрошприц МШ-1 или «Газохром-101» на 1 мкл.

8. Камеры для ТСХ с притертыми крышками (например, стеклянные четырехугольные сосуды 195 × 195 × 200 завода «Дружная горка»).

9. Пластины для ТСХ «Силуфол» размером 20 × 20 см (ЧССР).

10. Воронки делительные ВД-2-250 по ГОСТ 8613—75.

11. Колбы плоскодонные конические на 250 мл с НШ 29, тип КнКШ 250-29/32 по ГОСТ 10394-72.

---

* — Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания Т-2 токсина в пищевых продуктах и продовольственном сырье, утв. МЗ СССР 29 декабря 1984 г. № 3184-84

12. Колбы круглодонные на 250 мл с НШ 29, тип ККШ-250-29/32 по ГОСТ 10394-72.
13. Колбы грушевидные на 50 мл с НШ 14,5, тип ГрКШ-50-14/23 по ГОСТ 10394-72.
14. Колбы мерные на 100 мл, тип 2-100-2 по ГОСТ 1770-74.
15. Цилиндры мерные на 100 мл с притертой пробкой, тип 2-100 по ГОСТ 1770-74.
16. Распылитель стеклянный с грушей.
17. Т-2 токсин кристаллический, номер по каталогу Т 4887, фирма «Сигма», США (по поводу получения стандарта Т-2 токсина обращаться в Институт питания АМН СССР).
18. Ацетонитрил «ч» по ТУ 6-09-3534-74.
19. Ацетон «чда» по ГОСТ 2603-79.
20. Бензол «чда» по ГОСТ 5955-75.
21. Гексан «ч» по ТУ 6-09-3375-78.
22. Метанол «чда» по ГОСТ 6995-77.
23. Изопропиловый спирт (пропанол-2) «хч» по ТУ 6-09-402-75.
24. Кислота серная «чда» по ГОСТ 4204-77.
25. Калий хлористый «чда» по ГОСТ 4234-77.
26. Натрий сернокислый безводный «чда» по ГОСТ 4166-76.
27. Натрий углекислый «чда» по ГОСТ 83-79, свежепрокаленный.
28. Трифторуксусный ангидрид «ч» по ТУ 6-09-4135-75.

1. Экстракция

При отборе пробы для анализа следует руководствоваться требованиями ГОСТ 12430-66 «Сельскохозяйственная продукция. Методы отбора образцов при карантинном досмотре и экспертизе». Отобранную пробу измельчают в течение 1—2 минут в кофемолке или лабораторной мельнице. Навеску 20 г измельченного продукта помещают в плоскодонную коническую колбу на 250 мл, добавляют 10 мл 4% раствора хлористого калия и 90 мл ацетонитрила. Встряхивают на аппарате для встряхивания в течение 30 минут. Полученную смесь фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерный цилиндр, отбирают 70 мл фильтрата (аликвота соответствует 14 г исходного образца).

2. Очистка экстракта

2.1. Жидкость — жидкостная экстракция

В делительную воронку на 250 или 500 мл переносят 70 мл фильтрата, добавляют 50 мл гексана (или гептана). После встряхивания и разделения слоев верхний гексановый слой отбрасывают. Нижний ацетонитрильный слой еще дважды встряхивают с 40 мл гексана, каждый раз отбирая верхний гексановый слой. Ацетонитрильный слой разбавляют 17 мл дистиллированной воды и

экстрагируют 50 и 25 мл бензола. Верхние бензольные слои отделяют и сушат безводным сернокислым натрием (10—15 г) в течение 0,5 часа. Раствор фильтруют через химическую воронку с кусочком ваты в круглодонную колбу на 250 мл в НШ 29. Сернокислый натрий промывают 10 мл бензола и отфильтровывают бензол в ту же круглодонную колбу. Упаривают бензольный раствор на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 45—50° С досуха. Остаток растворяют в 200—300 мкл бензола и очищают с помощью препаративной ТСХ (раствор А).

2.2. Очистка с помощью препаративной ТСХ

Пластинку «Силуфол» (20 × 20 см) размечают. В правом и левом нижних углах пластинки на расстоянии 1,5 см от краев наносят по 5 мкл стандартного раствора Т-2 токсина в бензоле (по 500 нг Т-2 токсина). Параллельно нижнему краю пластинки на расстоянии 1,5 см от нижнего края равномерно наносят с помощью шприца на 10 мкл раствор А в виде прямой линии шириной не более 3 мм. После нанесения всего раствора А в круглодонную колбу добавляют еще 100—150 мкл бензола и наносят бензольную промывку на ту же прямую линию. Пластинку помещают в камеру для ТСХ со смесью гексан—изопропиловый спирт (7:2). Развивают пластинку до достижения фронтом растворителя карандашной линии, проведенной в 1,5 см от верхнего края пластинки. Пластинку извлекают из камеры и высушивают. Разрезают пластинку по линиям А и Б. Узкие полоски пластинки с нанесенным раствором Т-2 токсина опрыскивают 20% раствором серной кислоты в метаноле. Пластинки выдерживают в сушильном шкафу при 105° С в течение 1—3 минут и рассматривают в длинноволновом УФ-свете. Пятна Т-2 токсина (бело-голубая флуоресценция, Rf 0,6—0,7) обводят тонкой карандашной линией. Затем узкие полоски прикладывают к пластинке с нанесенным экстрактом и отмечают на этой пластинке зону, соответствующую хроматографической подвижности стандарта Т-2 токсина. Ширина зоны должна быть примерно на 7 мм (с каждой стороны) больше протяженности пятна стандарта Т-2 токсина в направлении развития хроматограммы; зону отмечают в виде 2 карандашных линий, параллельных нижнему краю пластинки. Силикагель из отмеченной зоны соскабливают с помощью скальпеля или шпателя в пробирку на 5 мл, приливают 4 мл смеси бензол—ацетон (1:1) и встряхивают. Суспензию силикагеля фильтруют через химическую воронку с кусочком ваты в грушевидную колбу на 50 мл с НШ 14,5. Силикагель повторно (2 × 4 мл) промывают смесью бензол—ацетон (1:1). Объединенные бензол-ацетоновые экстракты упаривают досуха на ротационном испарителе. Остаток переносят 200 мкл бензола в пробирку на 5 мл с НШ 14,5 (раствор В).

3. Обнаружение, идентификация и определение содержания Т-2 токсина

3.1. Приготовление стандартного раствора Т-2 токсина

Навеску 10 мг кристаллического Т-2 токсина помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки бензолом. Концентрация Т-2 токсина в стандартном растворе составляет 100 нг/мкл или 100 мкг/мл. Раствор хранят в холодильнике при температуре не выше +5° С. Срок годности стандартного раствора — до 2 лет.

3.2. Получение ТФА производных

а) получение ТФА производного стандарта Т-2 токсина

В мерную пробирку на 5 мл в НШ 14,5 добавляют 50 мкл стандартного раствора Т-2 токсина в бензоле, добавляют 250 мкл бензола, 30—50 мг свежепрокаленного углекислого натрия и 50 мкл трифторуксусного ангидрида. Пробирку плотно закрывают стеклянной притертой пробкой и перемешивают при 20—25° С в течение 0,5 часа на магнитной мешалке (в пробирку предварительно помещают «гвоздик» для перемешивания — кусочек металлической канцелярской скрепки длиной 3—4 мм, запаянный в стеклянный капилляр). Содержимое пробирки разбавляют бензолом до 1 мл и фильтруют через химическую воронку с кусочком ваты в другую пробирку на 5 мл с НШ 14,5, углекислый натрий на фильтре промывают 0,5 мл бензола. Объединенные бензольные фильтраты упаривают досуха в слабой струе азота (при отсутствии баллона с азотом можно упарить досуха на ротационном испарителе). Остаток растворяют в 200 мкл бензола и анализируют с помощью ГЖХ.

б) получение ТФА производных экстракта

К 300 мкл бензольного раствора очищенного экстракта (раствор В) добавляют углекислый натрий и трифторуксусный ангидрид и проводят получение ТФА производных аналогично п. 3.2.а.

3.3. ГЖХ анализ ТФА производных

Условия ГЖХ анализа: температура колонки — 200°, температура испарителя — 235°, температура термостата детектора — 270°, скорость газа-носителя — 90—100 мл/мин, скорость продувочного газа — 190—200 мл/мин, шкала чувствительности — $2 \cdot 10^{-12}$ А (на блок ИМТ).

В газовый хроматограф с помощью микрошприца на 1 мкл последовательно вносят 0,2 и 0,5 мкл (соответствуют 5 и 12,5 нг Т-2 токсина) раствора ТФА-производного стандарта Т-2 токсина в 200 мкл бензола (п. 3.2.А). В каждом случае регистрируют время удерживания (в данных условиях порядка 5—6 минут) и определяют

площадь пика ТФА производного Т-2 токсина ($S_{ст.}$). Площадь пика определяют умножением высоты пика на ширину пика на половине его высоты. Затем в газовый хроматограф вносят 0,5—1,0 мкл раствора ТФА производного экстракта (п. 3.2.б). При наличии пика, соответствующего по времени удерживания ТФА производному Т-2 токсина, определяют площадь ($S_{обр.}$).

Содержание Т-2 токсина в исходном образце определяют по формуле:

$$C = \frac{V_1 \cdot V_3 \cdot S_{обр.} \cdot m_{ст.}}{V_2 \cdot V_4 \cdot S_{ст.} \cdot M} \text{ (мкг/кг), где:}$$

$S_{обр.}$ — площадь пика ТФА производного Т-2 токсина в экстракте, в $мм^2$;

$S_{ст.}$ — площадь пика ТФА производного стандарта Т-2 токсина, в $мм^2$;

$m_{ст.}$ — масса стандарта Т-2 токсина, внесенная в хроматограф, в нг (5 или 12,5 нг);

M — масса исходного образца, в г (20 г);

V_1 — объем экстрагирующего растворителя, в мл (100 мл);

V_2 — объем фильтрата, взятый для анализа, в мл (70 мл);

V_3 — объем бензольного раствора ТФА производного экстракта, в мкл (200 мкл);

V_4 — объем бензольного раствора ТФА производного экстракта, внесенный в хроматограф, в мкл.

СОДЕРЖАНИЕ

I МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ 1

1. Методика определения афлатоксинов в пищевых продуктах методом ТСХ . . . 3
2. Методика определения афлатоксинов в пищевых продуктах с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии . . . 11
3. Методика определения афлатоксинов в продуктах животного происхождения . . . 19
4. Методика определения содержания патулина в фруктовых и овощных соках и пюре . . . 26
5. Методика определения микотоксина патулина в продуктах переработки плодов и овощей . . . 31
6. Методика определения зараленона в пищевых продуктах . . . 37
7. Методика определения дезоксиниваленола (вомитоксина) в зерне и зернопродуктах . . . 41
8. Методика определения дезоксиниваленола и зеараленона в зерне и зернопродуктах . . . 45
9. Методика определения Т-2 токсина в пищевых продуктах и продовольственном сырье . . . 53
10. Методика определения охратоксина А в пищевых продуктах . . . 57
11. Методики определения микотоксинов: Т-2 токсина, зеараленона (Ф-2) и охратоксина А . . . 63

II. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУЖЕРОДНЫХ ВЕЩЕСТВ 77

12. Атомно-абсорбционные методы определения токсичных элементов в пищевых продуктах и пищевом сырье . . . 77
13. Методика определения метил-этилмеркурхлорида в пищевых продуктах, кулинарно обработанных . . . 93
14. Методика определения содержания общей ртути в пищевых продуктах методом беспламенной атомной абсорбции . . . 97
15. Методика по определению хрома в овощных консервах . . . 103
16. Методика определения содержания гистамина в рыбопродуктах (флуорометрический метод) . . . 105
17. Метод выделения, идентификации и количественного определения гистамина в рыбопродуктах (колориметрический метод) . . . 110
18. Методика определения нитратов и нитритов в молоке и молочных продуктах . . . 114
19. Методика определения нитратов и нитритов в плодовоощной консервированной продукции . . . 124

III. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ 133

20. Методика определения остаточных количеств Диэтилстильбэстрола в продуктах животноводства и в биологических жидкостях . . . 133
21. Методика определения остаточных количеств Эстрадиола-17β в продуктах животноводства . . . 138
22. Методика определения антибиотиков тетрациклинового ряда методом тонкослойной хроматографии (качественный анализ) . . . 142
23. Методика определения антибиотиков тетрациклинового ряда флуориметрическим методом (количественный анализ) . . . 143
24. Определение летучих N-нитрозаминов в продовольственном сырье и пищевых продуктах . . . 146

Составители: Брагина И. В., Орехова Н. А. — специалисты лаборатории физико-химических методов исследований Российского Республиканского информационно-аналитического центра.
Под редакцией: Подуновой Л. Г. — заместителя Главного государственного санитарного врача РФ, заслуженного врача РФ.

Подписано к печати. 21.11.94.
Формат 60 × 88/16. Бумага офсетная. Усл. печ. л. 9,8. Усл. кр.-отт. 9,8.
Тираж 1000 экз. Зак. 220.

Изготовлено в Московской типографии № 11 Комитета по печати РФ.
113105, Москва, ул. Нагатинская, 1.

gost.e-ecolog.ru