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 МИКОТОКСИНА ПАТУЛИНА*

1. Аппаратура, материалы, реактивы

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания до 20 г и пределами допускаемой погрешности 0,1 мг.

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределами допускаемой погрешности 38 мг.

Спектрофотометр с диапазоном измерения, позволяющим проводить исследования при длине волны 275 нм, с допустимой абсолютной погрешностью измерений коэффициента пропускания не более 1%; кюветы кварцевые с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм.

Испаритель ротационный (ИР-1М2 или др.).

Насос водоструйный лабораторный по ГОСТ 25336.

Микрошприц МШ-10 вместимостью 10 мм.

Камера для тонкослойной хроматографии с притертой крышкой.

Облучатель ультрафиолетовый для обнаружения витаминов в растворе (модель 833) или люминоскоп ЛПК-1.

Термометр жидкостный стеклянный по ГОСТ 28498-90 с пределами измерения 0—100° С и ценой деления шкалы не более 1° С.

Стаканы по ГОСТ 25336 вместимостью 50 и 150 см^3.

---

* — из ГОСТ 28038-89 «Продукты переработки плодов и овощей. Метод определения микотоксина патулина»

Колбы мерные по ГОСТ 1770 с взаимозаменяемым конусом вместимостью 100 и 250 см³.

Цилиндры по ГОСТ 1770 с пришлифованной пробкой вместимостью 50 и 100 см³.

Воронка делительная по ГОСТ 25336 с пришлифованной пробкой вместимостью 250 см³.

Колба плоскодонная по ГОСТ 25336 вместимостью 250 см³.

Воронка лабораторная по ГОСТ 25336 диаметром 56 мм высотой 80 мм.

Колба грушевидная по ГОСТ 25366 с взаимозаменяемым конусом 14/23 вместимостью 100 см³.

Колба остродонная по ГОСТ 25336 с взаимозаменяемым конусом 14/23 вместимостью 25 см³.

Пипетка с делениями по ГОСТ 20292 исполнения 6 или 7 вместимостью 10 см³.

Пипетка с делениями по ГОСТ 20292 исполнения 4 или 5 1-го класса точности вместимостью 1 см³.

Эксикатор по ГОСТ 25336 с краном, с диаметром корпуса 250 мм.

Вставка для эксикатора по ГОСТ 9147 диаметром 230 мм исполнения 2.

Воронка капельная по ГОСТ 25336 вместимостью 50 см³.

Распылитель стеклянный с грушей.

Бумажные фильтры обеззоленные марки ФОМ.

Вата по ГОСТ 5556.

Силикагель Л, 100—160 или 100—250 мкм, фирма Лахема, ЧССР.

Пластинки для тонкослойной хроматографии «Силуфол» 15 × 15 см, фирма Кавалиер, ЧССР.

Патулин кристаллический.

Хлороформ технический по ГОСТ 20015 высшего сорта свежеперегнанный.

Спирт этиловый ректификованный технический по ГОСТ 18300.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.

Калий железистосинеродистый 3-водный по ГОСТ 4207, х. ч., раствор концентрацией 150 г/дм³ (раствор Карреза 1).

Цинк уксуснокислый 2-водный по ГОСТ 5823, ч. д. а., раствор концентрацией 300 г/дм³ (раствор Карреза II).

Эфир этиловый уксусной кислоты по ГОСТ 22300, ч. д. а. (этилацетат).

Ацетон по ГОСТ 2603, х. ч.

Толуол по ГОСТ 5789, ч. д. а.

Кислота муравьиная по ГОСТ 5848, ч. д. а.

Бензидин, ч. д. а., раствор в муравьиной кислоте концентрацией 5 г/дм³.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.

Натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4166 прокаленный, х. ч.

Калий марганцовокислый по ГОСТ 20490, х. ч., раствор концентрацией 15 г/дм^3.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

2. Подготовка к испытанию

2.1. Требования безопасности при проведении испытания

Помещение, в котором проводится определение патулина, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией.

Работу с хлором следует проводить в вытяжном шкафу лаборатории с использованием индивидуальных средств защиты (резиновые перчатки, защитные очки, фильтрующие респираторы РПГ-67-В или РУ-60 МВ), а также с соблюдением правил личной гигиены.

2.2. Приготовление первого стандартного раствора

1 мг кристаллического патулина количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят до метки хлороформом. Содержимое колбы тщательно перемешивают. Полученный первый стандартный раствор хранят в закрытой мерной колбе, плотно завернутой в алюминиевую фольгу, в холодильнике при температуре не выше 5° С. Срок годности стандартного раствора патулина — 6 месяцев.

Концентрацию патулина в стандартном растворе определяют спектрофотометрическим методом. Для этого пипеткой берут 6,0 см^3 стандартного раствора и количественно переносят в отгонную колбу. Раствор упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре 35—40° С. Сухой остаток растворяют в 9,0 см^3 этилового спирта и определяют оптическую плотность слоя раствора толщиной 1 см по отношению к контрольному раствору на спектрофотометре при длине волны 275 нм. В качестве контрольного раствора используют этиловый спирт.

Массовую концентрацию в стандартном растворе (С), мкг/см^3, вычисляют по формуле:

$$C = \frac{MDK \cdot 1000}{e \cdot l}, \text{ где:}$$

M — молярная масса патулина, M = 154 г/моль;
D — оптическая плотность раствора;
K — коэффициент разведения, K = 1,5;
e — молярный показатель поглощения раствора патулина в этиловом спирте при длине волны 275 нм, e = 1,46 × 10^4 дм^3 моль$^{-1}$см$^{-1}$;
l — толщина слоя раствора, см.

2.3. Приготовление второго стандартного раствора

Второй стандартный раствор патулина готовят разведением первого стандартного раствора хлороформом точно в 2 раза.

3. Проведение испытания

3.1. Приготовление водной вытяжки из образца

Навеску соков, пюре, напитков массой 50,0 г или повидла, джема, варенья, фруктового порошка массой 25,0 г помещают в стеклянный стакан, смешивают с небольшим количеством дистиллированной воды и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 см^3. В мерную колбу вносят 15 см^3 раствора Карреза 1 и 15 см^3 раствора Карреза II. Содержимое колбы доводят дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают и фильтруют в мерный цилиндр через бумажный складчатый фильтр. Собирают 50 см^3 фильтрата.

3.2. Экстракция

Фильтрат из цилиндра переносят в делительную воронку. Этим же цилиндром отмеряют 50 см^3 этилацетата, переносят его в делительную воронку и в течение 1 мин. интенсивно перемешивают содержимое. Смеси дают отстояться, и после полного разделения водный нижний слой сливают обратно в цилиндр, а этилацетатный экстракт переносят в сухую плоскодонную колбу. Экстрагирование остатков патулина из водной фазы проводят еще раз в аналогичных условиях свежей порцией этилацетата. При этом после одноминутного перемешивания в делительную воронку вносят 10 г хлористого натрия и продолжают перемешивать еще в течение 0,5 мин. После разделения слоев водную фазу отбрасывают, а объединенные этилацетатные экстракты высушивают в плоскодонной колбе при добавлении 15—20 г сернокислого натрия. После высушивания экстракт фильтруют через ватный тампон в отгонную грушевидную колбу. Оставшийся сернокислый натрий ополаскивают 10 см^3 этилацетата, которые затем также фильтруют в отгонную колбу. Экстракт упаривают на ротационном испарителе при температуре 35—40° С досуха.

3.3. Очистка экстракта*

Остаток в отгонной колбе растворяют в 2 см^3 хлороформа. Для очистки полученного экстракта готовят слой силикагеля и сернокислого натрия. Для этого в горло стеклянной воронки вставляют

---

* — очистку экстракта допускается не проводить при анализе напитков и неконцентрированных соков из яблок

ватный тампон, на который помещают суспензию, состоящую из 3 см³ (1,8 г) силикагеля в 15 см³ хлороформа. Хлороформу дают стечь и, не позволяя просохнуть слою силикагеля, сверху ровным слоем насыпают 3—4 г сернокислого натрия. Экстракт переносят на слой силикагеля и сернокислого натрия сразу после того, как хлороформ перестанет вытекать из воронки. С этого момента отбирают выходящий элюат в мерный цилиндр вместимостью 50 см³. Экстракту дают полностью впитаться в фильтрующий слой. Отгонную колбу ополаскивают еще двумя порциями по 2 см³ хлороформа, каждый раз давая жидкости полностью впитаться в фильтрующий слой. (Наливать экстракт следует аккуратно, так, чтобы слой сернокислого натрия не взмучивался). Элюирование продолжают, наливая на слой сернокислого натрия небольшие порции хлороформа. Первые 15 см³ элюата отбрасывают, следующие 45 см³ элюата собирают в другой цилиндр такой же вместимости, затем элюат количественно переносят в остродонную отгонную колбу и упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре 35—40° С.

3.4. Хроматографическое разделение

Остаток в отгонной колбе растворяют в 0,2 см³ хлороформа. Пластину «Силуфол» на расстоянии 2 см от краев размечают тонкими карандашными линиями. В точку пересечения линий в правом нижнем углу наносят с помощью микрошприца 0,02 см³ исследуемого раствора. В правом верхнем и левом нижнем углах на стартовых линиях отмечают по три точки, в которые микрошприцем наносят различные объемы первого стандартного раствора патулина. Количество патулина в пятнах должно быть от 10 до 80 нг. Пластинку одной их стартовых линий вниз помещают в камеру для тонкослойной хроматографии, предварительно заполненную смесью хлороформ — ацетон (4:1) на высоту около 1 см. Развитие хроматограммы проводят в первом направлении до достижении фронтом растворителя карандашной линии. Пластинку извлекают из камеры и сушат до исчезновения запаха растворителя. Высушенную пластинку помещают второй стартовой линией вниз в камеру для тонкослойной хроматографии, предварительно за- полненную смесью толуол — этилацетат — муравьиная кислота (5:4:1) на высоту около 1 см. Проводят развитие хроматограммы во втором направлении до достижения фронтом растворителя карандашной линии. Пластинку извлекают из камеры и сушат до исчезновения запаха растворителя.

3.5. Обнаружение патулина

На вставку эксикатора ставят стеклянный стакан вместимостью 150 см³ с 25 см³ раствора марганцовокислого калия, рядом поме-

щают хроматографическую пластинку. Эксикатор плотно закрывают крышкой и к раствору марганцовокислого калия по каплям приливают 25 см³ соляной кислоты из капельной воронки, вставленной в отверстие крышки эксикатора. По истечении 15 мин пластинку извлекают из эксикатора, оставляют еще на 10 мин в вытяжном шкафу, а затем опрыскивают из распылителя раствором бензидина. Хроматографическую пластинку сушат в токе холодного воздуха под тягой в течение 15—20 мин. Хроматограмму рассматривают в ультрафиолетовом свете. Патулин обнаруживается в виде желтых флуоресцирующих пятен. Обнаружение на пластинке пятна, соответствующего по цвету флуоресценции и хроматографической подвижности пятнам стандартного раствора патулина, свидетельствует о его наличии в анализируемом продукте. Количество патулина в пятне анализируемой пробы определяют, сравнивая размер и интенсивность флуоресценции пятен стандартного патулина и пятен патулина в анализируемой пробе.

4. Обработка результатов

Массовую долю патулина (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m_1 \cdot V_1 \cdot V_3}{m \cdot V_2 \cdot V_4} \cdot 10^{-7}, \text{ где}$$

m_1 — количество патулина, обнаруженное в пятне, нг;
V_1 — общий объем, до которого доведена навеска при прибавлении к ней воды, см³;
V_3 — общий объем хлороформного экстракта, см³;
m — масса навески продукта, г;
V_2 — объем фильтрата, отобранный на анализ, см³;
V_4 — объем хлороформного экстракта, наносимый на пластинку, см³.

За результат анализа принимают среднее арифметическое значение двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать $20 \cdot 10^{-7}\%$.

Если найденное значение массовой доли патулина в анализируемой пробе отличается от установленной нормы более, чем на $10 \times 10^{-7}\%$, его принимают за окончательный результат. Если равно или менее $10 \times 10^{-7}\%$, то следует провести повторное хроматографическое разделение на пластинке. При этом в точки на стартовых линиях необходимо наносить такие объемы второго стандартного раствора патулина, чтобы количество в них патулина максимально приближалось к количеству патулина в пятне анализируемой пробы при ее нанесении в том же количестве, что и в предыдущем случае.

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