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

МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ: Т-2 ТОКСИНА, ЗЕАРАЛЕНОНА (Ф-2) И ОХРАТОКСИНА*

1. Метод определения Т-2 токсина в фуражном зерне

Сущность метода заключается в извлечении токсина ацетоном, очистке экстракта от липидов и растительных пигментов с последующей доочисткой на хроматографической колонке и двукратном хроматографировании его на пластинке «Силуфол» со стандартным раствором токсина. Чувствительность метода — 600 мкг/кг кормового средства.

1.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Щуттель-аппарат
Баня водяная, электрическая (2—4-гнездная)
Весы аналитические марки ВДВ-200
Весы лабораторные 2-го класса точности по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г
Мельница лабораторная электрическая
Источник ультрафиолетовых лучей с длиной волны 365 мн марки ОИ-18, ВИО-1 или других аналогичных марок
Микрошприц вместимостью 0,01 см^3
Шкаф сушильный
Набор сит
Испаритель роторный
Распылитель стеклянный (пульверизатор)
Холодильник
Электрофен бытовой по ГОСТ 22314
Мельница шаровая
Эксикатор диаметром 29 см
Штатив Бунзена
Штатив для пробирок
Пробирки стеклянные мерные с притертой пробкой вместимостью 5 и 10 см^3 по ГОСТ 1770
Пробирки центрифужные вместимостью 10 см^3
Воронки стеклянные диаметром 4, 6, 8 см по ГОСТ 25336
Колбы конические с притертой пробкой вместимостью 500 и 250 см^3

---

* — из ГОСТ 28001-88 «Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения микотоксинов: Т-2 токсина, зеараленона (Ф-2) и охратоксина А»

Колбы мерные исполнений 1 и 2 вместимостью 25, 50, 100 см³ 2-го класса точности по ГОСТ 1770

Воронки делительные типа ВД, исполнений 1—3, вместимостью 500 см³ по ГОСТ 25336

Пипетки градуированные исполнений 1, 2, 4, 5 вместимостью 1, 2 и 10 см³ 2-го класса точности по ГОСТ 20292

Цилиндры мерные вместимостью 25, 50 и 100 см³ по ГОСТ 1770

Чашки фарфоровые диаметром 15 см по ГОСТ 9147

Колонка хроматографическая диаметром 1,8 см, высотой 18—20 см

Пластинки хроматографические «Силуфол» с флюоресцентным слоем марки ИУ-254, размером 15 × 15 см

Камера хроматографическая

Бумага лабораторная фильтровальная по ГОСТ 7584

Алюминия окись для хроматографии, 2-й степени активности по Брокману, ч

Ацетон по ГОСТ 2603, ч.д.а.

Гексан, х.ч.

Кальция окись по ГОСТ 8677, х.ч.

Кальций хлористый плавленный, ч.

Кислота азотная по ГОСТ 4461, х.ч.

Кислота муравьиная по ГОСТ 5848, х.ч.

Кислота уксусная, ледяная по ГОСТ 61, х.ч.

Кислота серная по ГОСТ 4204, х.ч.

Серебро азотнокислое по ГОСТ 1277, ч.д.а.

Силикагель марки КСК

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962

Толуол по ГОСТ 5789, ч.д.а.

Хлороформ для наркоза по ГОСТ 20015

Этилацетат по ГОСТ 22300, ч.

Стандарт микотоксина Т-2

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709

Примечание. Допускается использовать аппаратуру, мерную посуду или другие мерные средства измерений, имеющие аналогичные метрологические характеристики.

1.2. Подготовка к испытанию

1.2.1. Подготовка проб к испытанию

Из средней пробы фуражного зерна методом квартования выделяют часть пробы массой не менее 100 г, которую размалывают на электромельнице до такого состояния, чтобы она проходила без остатка через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Подготовленную для испытания пробу хранят в стеклянной колбе с крышкой в сухом темном месте.

1.2.2. Подготовка хроматографической колонки

Хроматографическую колонку заполняют в следующей последовательности: вначале помещают тампон гигроскопической ваты, затем 1 г силикагеля, 2 г окиси алюминия и 2 г окиси кальция. Силикагель и окись алюминия вносят небольшими порциями, слегка постукивая по колонке. Для удаления пузырьков воздуха промывают колонку небольшим количеством хлороформа (15—20 см) при отсасывании водоструйным насосом. Окись кальция вносят в колонку в виде хлороформной суспензии при отсасывании водоструйным насосом.

1.2.3. Приготовление растворов и реактивов

1.2.3.1. Приготовление 20%-ного спиртового раствора серной кислоты

11,5 см^3 серной кислоты небольшими порциями, при осторожном перемешивании, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 с небольшим количеством этилового спирта (15—20 мл). После охлаждения раствора постепенно, при постоянном перемешивании, добавляют в колбу этиловый спирт до метки. Охлаждают при комнатной температуре и окончательно доводят раствор в колбе спиртом до метки.

1.2.3.2. Приготовление системы растворителей

Растворитель 1. Гексан смешивают с этилацетатом в соотношении 1:1. Высота слоя налитой в хроматоргафическую камеру жидкости не должна превышать 0,5 см.

Растворитель 2. Толуол смешивают с этилацетатом и муравьиной кислотой в соотношении 6:3:1 или хлороформ смешивают с этилацетатом и уксусной ледяной кислотой в соотношении 17:3:1.

1.2.3.3. Приготовление водного раствора азотнокислого серебра с массовой долей 2%

1 г азотнокислого серебра помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3, добавляют дистиллированную воду до метки. Растовор хранят в холодильнике.

1.2.3.4. Приготовление силикагеля

Силикагель размалывают на шаровой мельнице и заливают на 18—20 часов соляной кислотой, разбавленной водой 1:1. Затем кислоту сливают и силикагель промывают водой до отсутствия в промывных водах следов иона хлора. Для этого в 1 см^3 промывных вод прибавляют 1 см^3 раствора азотнокислого серебра с массовой долей 2% и 1 см^3 азотной кислоты. В присутствии иона хлора выпадает осадок белого цвета. Затем силикагель промывают ацето-

ном, просушивают под тягой до исчезновения запаха ацетона и высушивают в сушильном шкафу при температуре 130° С в течение 4—6 ч. Очищенный и высушенный силикагель просеивают через сито. Для заполнения хроматографической колонки используют фракцию, проходящую через сито с размером отверстий 0,105 мм и задерживающуюся на сите — 0,075 мм. Силикагель хранят в плотно закрытых сосудах.

1.2.3.5. Подготовка окиси кальция, силикагеля и пластинки «Силуфол»

Окись кальция, силикагель и пластинки «Силуфол» перед использованием активируют нагреванием в сушильном шкафу при температуре 100° С в течение 1 ч. Окись кальция предварительно растирают в фарфоровой ступке.

1.2.3.6. Приготовление стандартного раствора микотоксина Т-2

Взвешивают в стаканчике вместимостью 25 см^3 0,0250 г (точная навеска) кристаллического микотоксина Т-2, переносят с помощью этилового спирта или ацетона в мерную колбу вместимостью 50 см^3 и доводят объем раствора спиртом или ацетоном до метки. В 1 см^3 раствора содержится 0,5 мг Т-2 токсина. Раствор устойчив в течение 3 месяцев при хранении на холоде.

1.3. Проведение испытания

1.3.1. Из подготовленной для испытания пробы зерна отбирают навеску массой 25 г и помещают в колбу вместимостью 500 см^3. В колбу вносят 150 см^3 ацетона и встряхивают на шуттель-аппарате 1,5 ч (либо оставляют на 18—20 ч при комнатной температуре). Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в колбу, а остаток корма еще раз заливают 100 см^3 ацетона, вновь встряхивают 30 мин. и фильтруют через тот же фильтр в соответствующую колбу. Фильтр промывают 10 см^3 ацетона, присоединяя фильтрат к общему ацетоновому экстракту, который переносят в делительную воронку. К ацетоновому экстракту добавляют 25 см^3 гексана, перемешивают и добавляют 50 см^3 воды. После разделения слоев гексановую фракцию (верхний слой) удаляют, а нижний слой (водно-ацетоновая фракция) повторно экстрагируют 25 см^3 гексана при перемешивании растворов. Выделив-шийся после отстаивания смеси верхний гексановый слой снова удаляют.

1.3.2. Водно-ацетоновую фракцию экстрагируют 25 см^3 хлороформа. Содержимое перемешивают 2 мин. и оставляют для разделения слоев. После разделения слоев хлороформную фракцию (нижний слой) собирают в отдельную колбу, а затем пропускают через подготовленную хроматографическую колонку. Очищенный на колонке от примесей экстракт собирают в колбу для отгона или

выпарительную чашку. Экстракцию водно-ацетоновой фракции хлороформом проводят еще два раза, экстрагируя каждый раз 20 см³ хлороформа и пропуская каждую порцию экстракта через хроматографическую колонку. Экстракты, очищенные на колонке, собирают вместе в колбе для отгона или выпарительной чашке. Затем колонку три раза промывают хлороформом по 30 см³ с последующим присоединением промывных порций к основному экстракту, находящемуся в колбе для отгона.

1.3.3. Колбу для отгона соединяют с перегонным аппаратом или роторным испарителем и содержимое ее концентрируют на кипящей водяной бане до 3 см³. При использовании выпарительной чашки раствор упаривают также на кипящей водяной бане до 2—3 см³. Концентрированный хлороформный экстракт переносят в центрифужную пробирку. Колбу трехкратно ополаскивают 1—1,5 см³ хлороформа, присоединяя эти порции к основному раствору в пробирке. Пробирку нагревают на водяной бане до полного удаления хлороформа. Нагревание ведут вначале при температуре 80—85° С, а затем по мере уменьшения объема раствора температуру снижают до 60° С.

1.3.4. Остаток в пробирке растворяют в 0,1 см³ ацетона и наносят микрошприцем на стартовую линию хроматографической пластинки «Силуфол». Пробы наносят по 0,01 см³ на расстоянии 1,5 см друг от друга и нижнего края пластинки. Одновременно с исследуемыми растворами на пластинку наносят 0,002 см³ стандартного спиртового или ацетонового раствора токсина Т-2. Пластинку с нанесенными пробами помещают в насыщенную парами растворителей хроматографическую камеру таким образом, чтобы стартовая линия располагалась на 0,5 см выше уровня подвижного растворителя. Первое хроматографирование проводят в системе этилацетат-гексан (1 : 1). Когда фронт растворителя продвинется на высоту 14,5 см от нижнего края пластинки, хроматограмму извлекают из камеры, 5—7 мин. подсушивают на воздухе, а затем 1—2 мин. в сушильном шкафу при температуре 100° С. После высушивания хроматограмму повторно помещают в камеру с системой растворителей хлороформ-этилацетат-уксусная кислота (17 : 3 : 1) или толуол-этилацетат-муравьиная кислота (6 : 3 : 1). Когда фронт смеси растворителей продвинется на высоту 14,5 см, хроматограмму извлекают из камеры, подсушивают на воздухе, обрабатывают 20%-ным спиртовым раствором серной кислоты из пульверизатора и помещают в сушильный шкаф с температурой 110° С. Пластинку выдерживают в сушильном шкафу 3—5 мин. до небольшого потемнения. После этого пластинку извлекают из шкафа, охлаждают и просматривают в ультрафиолетовых лучах длиной 365 нм.

1.4. Обработка результатов

Токсин Т-2 на хроматограмме в исследуемой пробе обнаруживают в виде пятна с голубой флюоресценцией, соответствующей

по положению и флюоресценции пятну токсина Т-2 в стандартной пробе. При использовании в повторном хроматографировании системы толуол-этилацетат-муравьиная кислота (6 : 3 : 1) Rf токсина Т-2 составляет 0,23—0,24, при применении системы хлороформ-этилацетат-уксусная кислота (17 : 3 : 1) — 0,20—0,23.

Результат считается положительным на наличие токсина Т-2 при обнаружении голубой флюоресценции на пластинке «Силуфол» в исследуемой пробе, соответствующей по положению флюоресценции пятну стандартного раствора Т-2 токсина хотя бы в одной из двух параллельных проб.

2. Метод определения содержания зеараленона (Ф-2) в фуражном зерне, продуктах его переработки и комбикормах

Сущность метода заключается в экстракции зеараленона (Ф-2) из кормов смесью ацетонитрила и раствора хлористого калия, его очистке и хроматографировании на пластинках «Силуфол» с последующим измерением интенсивности флюоресценции или интенсивности его окрашивания красным прочным ЖЖ в сравнении со стандартным раствором зеараленона. Чувствительность метода 50 мкг/кг кормового средства.

2.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Мельница лабораторная электрическая

Весы лабораторные 2-го класса точности по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г.

Весы аналитические марки АДВ-200

Насос водоструйный

Испаритель роторный

Баня водяная электрическая (2-4-гнездная)

Источник ультрафиолетовых лучей длиной волны 253 нм марки ВИО-1, или других аналогичных марок или хроматоскоп

Шуттель-аппарат

Набор сит

Микрошприц вместимостью 0,01 $см^3$

Распылитель стеклянный (пульверизатор)

Шкаф сушильный

Электрофен бытовой ГОСТ 22314

Холодильник

Штатив Бунзена

Штатив для пробирок

Бумага лабораторная фильтровальная по ГОСТ 7584

Колбы конические с притертой пробкой вместимостью 500 $см^3$

Воронки делительные типа ВД, исполнений 1—3, вместимостью 250—500 $см^3$ по ГОСТ 25336

Силикагель АСК

Пробирки стеклянные мерные с притертой пробкой вместимостью 5—10 см³ по ГОСТ 1770

Пластинки хроматографические «Силуфол» с флюоресцентным слоем марки ИУ-254, размером 15 ×15 см и 20 × 20 см

Цилиндры мерные вместимостью 10, 50, 100, 250 см³ по ГОСТ 1770

Камера хроматографическая

Чашки выпарительные фарфоровые на 8 и 15 см

Пипетки градуированные исполнений 1, 2, 4, 5 вместимостью 1, 2, 10 см³ 2-го класса точности по ГОСТ 20292

Колбы мерные исполнений 1, 2 вместимостью 25, 50, 100, 500, 1000 см³ 2-го класса точности по ГОСТ 1770

Воронки стеклянные диаметром 6 см по ГОСТ 25336

Гексан, х. ч.

Ацетонитрил, ч.

Хлороформ для наркоза по ГОСТ 20015

Бензол по ГОСТ 5955, х. ч.

Толуол по ГОСТ 5789, ч. д. а.

Этилацетат по ГОСТ 22300, ч.

Калий хлористый по ГОСТ 4234, х. ч.

Свинец уксуснокислый по ГОСТ 4166, ч. д. а.

Силикагель АСК по ГОСТ 3956

Муравьиная кислота по ГОСТ 5848, ч. д. а.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962, с массовой долей 50%

Диатомовая земля (целит 545)

Кислота уксусная ледяная по ГОСТ 61, х. ч.

Красный прочный ЖЖ (п-нитрофенилдиазония тетрафторборат, стабилизированная соль)

Стандарт зеараленона (Ф-2)

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709

Примечание. Допускается использовать аппаратуру, мерную посуду или другие мерные средства измерений, имеющие аналогичные метрологические характеристики.

2.2. Подготовка к испытанию

2.2.1. Подготовка проб к испытанию

Из средней пробы фуражного зерна или продуктов его переработки и комбикормов методом квартования выделяют часть пробы массой не менее 150 г, которую размалывают на электромельнице до такого состояния, чтобы она проходила без остатка через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Подготовленную для испытания пробу хранят в стеклянной колбе с крышкой в темном месте.

2.2.2. Приготовление растворов и реактивов

2.2.2.1. Приготовление раствора хлористого калия с массовой долей 4%

4 г хлористого калия вносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и растворяют в воде, после чего воду доливают до метки.

2.2.2.2. Приготовление раствора уксуснокислого свинца

200 г уксуснокислого свинца помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³, заливают 3 см³ уксусной кислоты и разбавляют водой до метки.

2.2.2.3. Приготовление раствора красного прочного ЖЖ с массовой долей 0,05%

12,5 мг красного прочного ЖЖ вносят в мерную колбу вместимостью 25 см³ и растворяют в 50%-ном этиловом спирте. После растворения этим же растворителем доводят объем раствора до метки. Раствор готовят перед применением.

2.2.2.4. Приготовление системы подвижных растворителей

Растворитель 1. Толуол смешивают с этилацетатом и муравьиной кислотой в соотношении 6 : 3 : 1.

Растворитель 2. Бензол смешивают с ацетонитрилом в соотношении 98 : 2.

2.2.2.5. Приготовление стандартного раствора зеараленона

В мерную колбу вместимостью 10 см³ вносят 1 мг зеараленона, растворяют в бензоле и доводят объем до метки. Массовая концентрация раствора микотоксина должна составлять 100 мкг/см³. Для приготовления стандартного рабочего раствора берут 1 см³ приготовленного раствора, переносят в мерную колбу вместимостью 10 см³, доводят объем раствора бензолом до метки и получают массовую концентрацию зеараленона 10 мкг/см³. Растворы устойчивы к использованию в течение 6 месяцев при хранении в темном холодном месте.

2.3. Проведение испытания

2.3.1. Из размолотой средней пробы корма берут навеску массой 50 г с погрешностью не более 0,01 г и помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 500 см³.

Для проведения экстракции в колбу с навеской вносят 180 см³ ацетонитрила, 20 см³ раствора хлористого калия с массовой долей 4%. Колбу накрывают пробкой и взбалтывают на шуттель-аппарате

30 минут, после чего содержимое фильтруют через фильтровальную бумагу.

2.3.2. Полученный фильтрат очищают. 100 см³ фильтрата помещают в делительную воронку, где фильтрат четырехкратно обезжиривают гексаном по 50 см³ каждый раз. Очищенную (нижнюю) фазу ацетонитрила переносят либо в колбу роторного испарителя, либо в выпарительную чашку и выпаривают досуха при температуре 80° С. К полученному сухому остатку добавляют 20 см³ ацетонитрила, 60 см³ воды и 20 см³ раствора уксуснокислого свинца. Перемешивают и ставят в водяную баню на 10—15 минут при температуре 80° С до образования осадка или помутнения. Затем добавляют 5 г силикагеля АСК (или целита), перемешивают и фильтруют через фильтровальную бумагу. 50 см³ фильтрата помещают в делительную воронку и проводят тройную переэкстракцию хлороформом по 50 см³ каждый раз. Хлороформную фракцию (нижнюю) собирают в выпарительную чашку и упаривают досуха на водяной бане при температуре 80° С. Сухой остаток растворяют 5 см³ хлороформа, количественно переносят в пробирку с притертой пробкой и упаривают досуха на водяной бане. Сухой остаток растворяют в 0,5 см³ смеси бензол-ацетонитрил (98 : 2) и пробирку закрывают плотно пробкой.

2.3.3. Для определения содержания зеараленона проводят одномерную или двухмерную тонкослойную хроматографию на пластинках «Силуфол».

2.3.3.1. Одномерную тонкослойную хроматографию проводят на пластинку размером 15 × 15 см. Отступая на 1,5 см от края пластинки, наносят 0,005; 0,01 и 0,015 см³ стандартного раствора зеараленона и 0,025 см³ растворенного в смеси бензол-ацетонитрил экстракта исследуемой пробы. Разгонку проводят в системе толуол-этилацетат-муравьиная кислота (6 : 3 : 1), пластинку просушивают на воздухе и просматривают под источником ультрафиолетовых лучей. По характерному сине-голубому свечению стандартного раствора зеараленона на этом же уровне в хроматограмме определяют наличие таких же пятен и свечения в экстракте исследуемой пробы корма. В случае интенсивного свечения пятен зеараленона в экстракте исследуемой пробы корма, превышающей подобное же свечение в точке нанесения наибольшего количества стандартного раствора зеараленона, в исследуемую пробу дополнительно вносят смесь бензол-ацетонитрил (98 : 2), доводя объем до 1 см³, 1,5 см³ и т. д. или наносят на пластинку меньшее количество экстракта исследуемой пробы. Для окончательного решения о принадлежности пятен к микотоксину зеараленону хроматограмму орошают из пульверизатора раствором красного прочного ЖЖ и помещают ее в сушильный шкаф при 100—105° С на 5 мин. Пятна с наличием зеараленона окрашиваются в желтый цвет.

2.3.3.2. Двухмерную тонкослойную хроматографию проводят в случае невозможности достаточной очистки экстрактов или сом-

нения в результатах исследований при проведении одномерной хроматографии. Для этого используют пластинку «Силуфол» размером 20 × 20 см.

Хроматограмму проявляют в системе бензол-ацетон (98 : 2) в направлении I до уровня, на 1,5—2 см. Затем ее просушивают и просматривают в ультрафиолетовом свете с длиной волны 253 нм и возможные пятна зеараленона отмечают карандашом. Затем хроматограмму проявляют в направлении II в системе толуол-этилацетат-муравьиная кислота (6 : 3 : 1) до уровня, не достигающего 1,5—2 см. Пластинку просушивают, просматривают под ультрафиолетовыми лучами и определяют наличие зеараленона в исследуемой пробе.

2.4. Обработка результатов

Содержание зеараленона в пробе (X) в миллиграммах на 1 килограмм корма в соответствии с интенсивностью свечения стандартного и испытуемого раствора вычисляют по формуле:

$$C = \frac{A \cdot B \cdot D}{12{,}5 \cdot C}, \text{ где:}$$

A — массовая концентрация зеараленона в стандартном растворе, мкг/см^3;

B — конечный объем экстракта, учитывая возможное разбавление, см^3;

C, D — соответственно объемы экстракта и стандартного раствора зеараленона с одинаковой интенсивностью свечения, см^3;

12,5 — масса пробы корма, соответствующая объему экстракта, подвергнутого очистке, г.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Результат вычисляют до третьего десятичного знака и округляют до второго десятичного знака.

3. Метод определения содержания охратоксина А в фуражном зерне, продуктах его переработки и комбикормах

Сущность метода заключается в извлечении микотоксина из кормов смесью хлороформа и раствора ортофосфорной кислоты, двойной переэкстракции микотоксина и проведении тонкослойной хроматографии. Чувствительность метода — 10 мкг/кг кормового средства.

3.1. Аппаратура, материалы и реактивы

Баня водяная, электрическая (2—4-гнездная)
Весы аналитические марки АДВ-200
Весы лабораторные 2-го класса точности по ГОСТ 24104 с наибольшим пределом взвешивания 200 г
Мельница лабораторная электрическая
Источник ультрафиолетовых лучей длиной волны 365 нм марки ВИО-1, ОЛД-41, ОИ-18 или других аналогичных марок
Микрошприц вместимостью 0,01 $см^3$
Набор сит
Распылитель стеклянный (пульвелизатор)
Шкаф сушильный
Холодильник
Шуттель-аппарат
Электрофен бытовой по ГОСТ 22314
pH-метр
Воронка делительная типа ВД, исполнений 1—3, вместимостью 500 $см^3$ по ГОСТ 25336
Штатив Бунзена
Штатив для пробирок
Камера хроматографическая
Пробирки стеклянные мерные с притертой пробкой вместимостью 5 $см^3$ по ГОСТ 1770
Колбы конические с притертой пробкой вместимостью 250 и 500 $см^3$
Колбы мерные исполнений 1, 2, вместимостью 1000 $см^3$, 2-го класса точности по ГОСТ 1770
Воронки стеклянные диаметром 3, 8 см по ГОСТ 25336
Цилиндр мерный вместимостью 250 $см^3$ по ГОСТ 1770
Пипетки градуированные, исполнений 1, 2, 4, 5, вместимостью 1 и 10 $см^3$, 2-го класса точности по ГОСТ 20292
Чашки фарфоровые выпарительные диаметром 8 см
Бумага фильтровальная
Пластинки хроматографические «Силуфол» с флюоресцентным слоем марки ИУ-254, размером 15 × 15 см
Кислота фосфорная орто по ГОСТ 6552, ч., раствор 0,1 моль/$дм^3$
Хлороформ для наркоза по ГОСТ 20015
Натрий двууглекислый по ГОСТ 2156, ч., раствор 0,1 моль/$дм^3$
Бензол по ГОСТ 5955, х. ч.
Кислота муравьиная по ГОСТ 5848, ч. д. а.
Кислота уксусная ледяная по ГОСТ 61, х. ч.
Толуол по ГОСТ 5789, ч. д. а.
Этилацетат по ГОСТ 22300, ч.
Аммиак водный по ГОСТ 3760
Стандарт охратоксина А
Вода дистиллированная по ГОСТ 6709

Примечание. Допускается использовать аппаратуру, мерную посуду или другие мерные средства измерений, имеющие аналогичные или лучшие метрологические характеристики.

3.2. Подготовка к испытанию

3.2.1. Подготовка проб к испытанию

Из средней пробы фуражного зерна, продуктов его переработки и комбикормов методом квартования выделяют часть пробы массой не менее 150 г, которую размалывают на электромельнице до такого состояния, чтобы она проходила без остатка через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Подготовленную для испытания пробу хранят в стеклянной колбе с крышкой в сухом темном месте.

3.2.2. Приготовление растворов и реактивов

3.2.2.1. Приготовление системы подвижных растворителей

Толуол смешивают с этилацетатом и муравьиной кислотой в соотношении 6 : 3 : 1.

3.2.2.2. Приготовление 0,1 моль/дм^3 раствора ортофосфорной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1000 см^3, содержащую 500 см^3 дистиллированной воды, вносят 9,8 г (6 см^3) ортофосфорной кислоты, перемешивают и доводят объем раствора до метки водой.

3.2.2.3. Приготовление подкисленного раствора хлороформа

К 10 см^3 хлороформа прибавляют 1 каплю ледяной уксусной кислоты.

3.2.2.4. Приготовление 0,1 моль/дм^3 раствора двууглекислого натрия

90,5 г двууглекислого натрия вносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3, растворяют в воде и доводят объем до метки.

3.2.2.5. Приготовление стандартного раствора охратоксина А

5 мг кристаллического охратоксина А растворяют в 5 см^3 подкисленного хлороформа, переносят количественно в мерную колбу на 10 см^3 и доводят объем раствора до метки подкисленным хлороформом. Из полученного раствора берут 0,5 см^3, переносят в мерную колбу на 25 см^3 и доводят объем раствора до метки подкисленным хлороформом. Рабочий стандартный раствор со-

держит в 1,0 см³ 10 мкг охратоксина А. Раствор хранят в холодильнике.

3.3. Проведение испытания

3.3.1. Проводят экстрагирование охратоксина А из комбикорма. Для этого навеску измельченного корма массой 50 г переносят в колбу вместимостью 500 см³. Заливают 25 см³ 0,1 моль/дм³ раствора ортофосфорной кислоты и 250 см³ хлороформа, встряхивают на шуттель-аппарате в течение 30 мин. или экстрагируют путем настаивания в течение 16—18 ч.

3.3.2. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр, переносят в делительную воронку вместимостью 500 см³, прибавляют к нему 200 см³ 0,1 моль/дм³ раствора натрия двууглекислого и перемешивают. После разделения смеси хлороформный слой удаляют, а водный остаток подкисляют муравьиной кислотой до pH 2—3 и прибавляют к нему 50 см³ чистого хлороформа. Содержимое делительной воронки вновь перемешивают. После разделения слоев хлороформный слой сливают в фарфоровуют чашку, а водный остаток повторно обрабатывают 50 см³ хлороформа, которые после отделения объединяют с первой порцией и упаривают досуха при температуре не выше 60° С.

3.3.3. Наличие охратоксина А в корме определяют качественно и полуколичественно.

3.3.3.1. Качественное определение охратоксина А

Сухой остаток экстракта растворяют в 1 см³ подкисленного хлороформа. На хроматографическую пластинку наносят микрошприцем 0,002 см³ стандартного раствора микотоксина и 0,01 см³ экстракта исследуемой пробы. Пластинку подсушивают электрофеном. Точки нанесения обоих растворов должны быть на расстоянии не менее 1 см друг от друга и 1,5 см от бокового края пластинки.

Пластинку помещают в вертикальном положении в хроматографическую камеру, заполненную системой растворителей толуол-этилацетат-муравьиная кислота (6:3:1). После того, как фронт растворителей поднимется на высоту 10—12 см старта, пластинку вынимают из камеры, подсушивают в токе теплого воздуха до удаления запаха растворителей и просматривают под источником ультрафиолетовых лучей с длиной волны 365 нм. Сравнивая зелено-голубое свечение стандартного раствора охратоксина А с характером свечения исследуемой пробы, делают предварительный вывод о наличии или отсутствии в исследуемой пробе корма микотоксина. С целью подтверждения наличия охратоксина А в иследуемой пробе хроматограмму помещают на 5 мин. в камеру с парами аммиака, под воздействием которых охратоксин А изме-

няет флюоресценцию от зелено-голубой до темно-голубой. В случае качественного выявления в исследуемой пробе охратоксина А, проводят полуколичественное определение микотоксина.

3.3.3.2. Полуколичественное определение содержания охратоксина А

0,5 см^3 раствора экстракта, используемого для качественного определения, смешивают с 4,5 см^3 хлороформа, перемешивают и наносят на хроматографическую пластинку 0,001; 0,003; 0,005; 0,01 см^3 исследуемого экстракта и 0,002 см^3 стандартного раствора охратоксина А. Просмотром хроматограмм под источником ультрафиолетовых лучей определяют по интенсивности зелено-голубого свечения предельно-минимальное количество охратоксина А в исследуемой пробе. Если на хроматограмме в минимальном объеме исследуемого раствора имеется пятно охратоксина А, превосходящее по интенсивности свечения стандартный раствор охратоксина А, исследуемый раствор разбавляют в 10 и более раз до получения на хроматограмме выявляемого свечения охратоксина А.

Содержание охратоксина А в исследуемой пробе (X_1) в микрограммах на 1 кг корма вычисляют по формуле:

$$C=\frac{2\cdot 0{,}001\cdot W_2\cdot 1000}{W_1\cdot M}$$, где:

W_1 — минимальный объем исследуемого раствора, в котором установлено предельно-выявляемое свечение охратоксина А, см^3;

W_2 — общий объем исследуемого раствора, см^3;

M — масса навески исследуемой пробы, г;

0,001— минимальное количество охратоксина А, выявляемое на пластине «Силуфол» под источником УФЛ, мкг;

2 — коэффициент, учитывающий потери вещества в ходе анализа.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Результат вычисляют до третьего десятичного знака и округляют до второго десятичного знака.

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