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

III. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ДИЭТИЛСТИЛЬБЭСТРОЛА В ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОВОДСТВА И В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

(химический метод)*

Принцип метода

Метод основан на экстракции ДЭС и его конъюгатов полярным растворителем из мяса и субпродуктов, кислотном гидролизе конъюгатов в спиртовом растворе, очистке перераспределением в растворителях и адсорбционной хроматографией и количественном измерении с применением специфической фотохимической реакции и ГЖХ.

---

* — Методические рекомендации по определению химическим методом остаточных количеств диэтилстильбэстрола в продуктах животноводства и в биологических жидкостях, утв. МЗ СССР 09.12.83 г. № 2944-83

Реактивы

Хлороформ, ГОСТ 3160-51, х ч., перегнанный

Эфир диэтиловый медицинский или ГОСТ 6255—52

Изооктан, х. ч.

Этанол, х. ч., перегнанный

Бензол, х. ч. для хроматографии

Метанол, х. ч.

Соляная кислота, конц., ГОСТ 3113-67, х. ч.

Гидрат окиси натрия, ГОСТ 4328-66, х. ч.

Натрий сернокислый, безводный, ГОСТ 4166-76, х. ч.

β-глюкуронидаза, х. ч.

Силикагель Л, 40/100 для колоночной хроматографии

Пластины силуфола или пластины с нанесенным слоем силикагеля для тонкослойной хроматографии

Бумага для хроматографии (Ленинградская быстрая, или Фильтрак, или Ватман)

Целит, х. ч.

Ангидрид гептафтормасляный или трифторуксусный, х. ч.

Диэтилстильбэстрол, кристаллический, стандартный препарат, х. ч.

Оборудование и лабораторная посуда

Скоростной смеситель типа РТ-1

Ротационный испаритель типа ЛГ-108

Аппарат для встряхивания проб типа АВУ-60

Хроматоскоп ФМТ или ртутная лампа типа ПРК-4

Центрифуга типа ЦЛС 31М

Газовый хроматограф *Цвет-106*

Насос водоструйный, ГОСТ 10696-75

Баня водяная типа ТУ 64-1-432-72 с электронагревателем

Денситометр типа ИРЕ-65.

Камера для тонкослойной хроматографии с притертой крышкой, например, стеклянный четырехугольный сосуд 195 × 195 × 200 мм завода «Дружная горка»

Термометр от 0° до 100°, ГОСТ 2045-71

Колбы мерные вместимостью 25, 50 и 100 мл, ГОСТ 1770-74

Склянки с притертыми пробками на 500 мл

Стаканы хим. на 250 и 500 мл

Ступка, ГОСТ 2045-71

Стеклянная колонка для экстракции, размером 480 см

Стеклянная колонка для хроматографии, размером 0,7 × 30 см или пипетка на 10 мл с ровно отрезанным основанием

Воронки стеклянные диаметром 100 мм, ГОСТ 86В-75

Бюхнеровская воронка, ГОСТ 93-75

Пробирки хим. на 5 и 10 мл с НШ № 14,5 с притертыми пробками, ГОСТ 10515—75

Колбы для упаривания на 50, 250 и 500 мл с НШ № 14,5 и НШ № 28, ГОСТ 10394-72.

Делительные воронки вместимостью 250 и 500 мл, ГОСТ 8613-75

Цилиндры мерные вместимостью 50, 100 и 250 мл, ГОСТ 1770-74

Колбы плоскодонные на 100 и 250 мл с НШ № 14,5, ТУ 48-52

Пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл, ГОСТ 20292-74

Микропипетки на 0,1 и 0,2 мл, ГОСТ 1770-74

Подготовка к определению

Перед проведением анализа необходимо подготовить колонку для адсорбционной хроматографии. Силикагель стандартизуют обезвоживанием и добавлением 5% воды. 5 г силикагеля помещают тонким слоем в стеклянный бюкс и прогревают при 200° в сушильном шкафу в течение 3 часов. Затем к силикагелю добавляют 5% воды (объем/вес силикагеля), тщательно перемешивают, помещают в аппарат для встряхивания и встряхивают в течение 30 мин. К силикагелю добавляют хлороформ (15—20 мл), перемешивают, суспензию переносят на колонку и формируют колонку размером 0,7 × 7,0 см. Так как силикагель очень быстро адсорбирует воду, то промежутки времени между стадиями его стандартизации и хроматографии должны быть минимальны. При использовании каждой новой партии силикагеля необходимо с применением стандарта ДЭС проводить контрольные исследования условий элюции препарата с колонки.

Определение ДЭС в мясе и субпродуктах

Экстракция образцов мяса и субпродуктов выполняется в 2 этапа: в скоростном смесителе и на колонке с применением целита. 20 г ткани мышц, печени или почек тщательно измельчают (готовят фарш), растирают в ступке и экстрагируют в скоростном смесителе — 60 мл 96% этанола. Тканевые остатки отделяют фильтрованием через бумажный фильтр на бюхнеровской воронке и реэкстрагируют 96% этанолом (60 мл) в смесителе (1 стадия экстракции). После фильтрования тканевые элементы смешивают с 10 г целита и образовавшуюся «пушистую смесь» переносят на колонку, уплотняют и дополнительно экстрагируют на колонке 150 мл 96% этанола (2 стадия экстракции). Экстракты 1 и 2 стадии объединяют.

Гидролиз конъюгированных форм ДЭС проводится соляной кислотой в этаноле. К объединенному этанольному экстракту добавляют 10 мл 2 н HCl и выпаривают на роторном испарителе до объема 20—25 мл в течение 50—60 мин. при температуре 55° С. Выпавший осадок отделяют фильтрованием через бумажный фильтр.

Таблица 1

Распределение ДЭС между водной фазой и растворителем

Растворитель	Водная фаза	Коэффициент распределения
Хлороформ	вода	0,016
Хлороформ	1 н NaOH	16,6
Эфир	вода	0,01
Эфир	1 н NaOH	20,0

Примечание. $$\text{Коэффициент распределения} = \frac{\text{концентрация ДЭС в водной фазе}}{\text{концентрация ДЭС в растворителе}}$$

Таблица 2

Отделение ДЭС от различных веществ методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей: эфир-бензол (1:5)

Вещество	Rf
Диэтилстильбэстрол	0,5
Эстрон	0,57
Холестерин, холестерилкапронат, триолеин, трибутирин	> 0,60
Эстрадиол-17β, эстрадиол-17α, 16α-оксиэстрон, 16-кето-17β-эстрадиол, тестостерон, эпитестостерон	< 0,40
Эстриол, 17-эпиэстриол, 6α-оксиэстрадиол, кортизол, кортизон, кортикостерон, альдостерон	< 0,20

Отфильтрованный гидролизат переносят в плоскодонную колбу, добавляют 40 мл дистиллированной воды, 60 мл хлороформа и встряхивают в аппарате для встряхивания в течение 30 мин. После разделения фаз в делительной воронке водную фазу реэкстрагируют 60 мл хлороформа. Хлороформные фазы объединяют, промывают 40 мл дистиллированной воды (встряхиванием в делительной воронке в течение 1—2 мин); водную фазу отбрасывают.

Перераспределение в системе растворителей — $CHCl_3$-NaOH (табл. 1) проводят в 2-х делительных воронках, содержащих по 50 мл 1 н NaOH. Хлороформный экстракт вносят в каждую из делительных воронок, встряхивая со щелочью в течение 2 мин. Хлороформ отбрасывают, NaOH-фазы объединяют, подкисляют 2 н HCl до pH 4,0 и дважды экстрагируют равным объемом хлороформа. Хлороформные экстракты объединяют, фильтруют через безводный Na_2SO_4 (5—7 г) и выпаривают на роторном испарителе.

В случае образования эмульсии при экстракции хлороформом разделение фаз достигается центрифугированием при 5000 об. в течение 20 мин.

Хроматография на колонке силикагеля Л проводится методом ступенчатой элюции. Исследуемую пробу в 1—2 мл хлороформа наносят на колонку. Затем на колонку последовательно наносят следующие элюирующие растворы: 20 мл хлороформа (фракция № 1, не содержащая ДЭС), 10 мл 1% этанола в хлороформе (фракция № 2, не содержащая ДЭС), 30 мл 1,5% этанола в хлороформе (фракция № 3, содержащая ДЭС). Фракцию № 3 выпаривают до минимального объема.

Тонкослойная хроматография с последующей денситометрией рассчитана на окончательную очистку экстрактов (табл. 2) и количественное измерение с использованием специфической фотохимической реакции. После хроматографии на колонке сконцентрированную фракцию № 3, содержащую ДЭС, наносят на пластину силуфола и хроматографируют в системе растворителей: эфир-бензол (1:5). В дальнейшем проводят фотохимическую реакцию непосредственно на хроматограмме — пластину облучают в УФ-свете в течение 30 мин на ртутной лампе (или Хроматоскопе). Под влиянием УФ-света происходит превращение ДЭС в желто-окрашенный трициклический дикетон фенантреновой серии и на белом фоне пластины появляются желтые пятна продукта фотохимической реакции. Вырезают полосу хроматограммы размером 4 × 15 см (с проявленными пятнами) и денситометрируют в отраженном свете на денситометре ИРЕ-65. Количество ДЭС определяют по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой готовят следующие разведения ДЭС в 96% этаноле: 4 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 40 мкг/мл, 80 мкг/мл, 160 мкг/мл. По 0,05 мл каждой пробы наносят на пластину силуфола, хроматографируют и проявляют пластину, как описано выше. Денситометрический метод позволяет выявить 0,0002 мг ДЭС в образце мясопродукта, весом 20 г; при пересчете на 1 кг — 0,004 мг/кг.

Хроматография на бумаге проводится при использовании ГЖХ — способа количественного измерения. Частично очищенные экстракты после хроматографии на клонке силикагеля (фракция № 3, содержащая ДЭС), а также стандарт ДЭС (5—10 мкг) наносят на полосу хроматографической бумаги и хроматографируют (нисходящий метод) в системе растворителей: бензол-метанол-вода (5:7:3). Полоску бумаги, соответствующую стандарту ДЭС, вырезают и облучают в УФ-свете (оставшуюся полосу бумаги с опытными пробами не облучают). В результате облучения на бумаге появляются желтые пятна продукта фотохимической реакции. По локализации стандарта устанавливают участки хроматограммы, соответствующие расположению ДЭС исследуемых проб. Эти участки бумаги вырезают, измельчают ножницами и помещают в пробирку с 10 мл этанола. Элюцию проводят в течение 10 часов; элюат выпаривают.

ГЖХ-способ количественного измерения рассчитан на анализ фторпроизводных ДЭС. Для их получения сухой остаток (после

выпаривания элюата) растворяют в 0,5 мл бензола, добавляют 10 мкл ангидрида (гептафторомасляного или трифторуксусного) и инкубируют 30 мин при 60°. Смесь высушивают под током азота, сухой остаток растворяют в 0,5 мл бензола и проводят ГЖХ; остатки ангидрида после инкубации могут быть удалены промыванием водой: к 0,5 мл смеси добавляют 0,3 мл дистиллированной воды, встряхивают 0,5—1 мин и центрифугируют (бензольную фазу используют для ГЖХ). Условия ГЖХ-анализа (детектор электронного захвата): стеклянная колонка размером 3 метра с 5% SE-60 на Хроматоне N-AW ГМДС; температура испарителя 230°, колонки — 190°, детектора — 240°; газ-носитель — азот, 40 мл/мин. В этих условиях время удерживания дигептафторбутирата ДЭС составляет 7 мин. ГЖХ-метод позволяет выявить 1—10 нг ДЭС в пробе.

Особенности метода при определении ДЭС в биологических жидкостях и в жировой ткани

Особенности определения ДЭС в биологических жидкостях касаются стадии гидролиза, экстракции и очистки перераспределением в растворителях (остальные стадии, как в основной прописи метода). К пробе биологической жидкости (3—5 мл желчи, мочи или молока) добавляют 0,1 М ацетатный буфер, pH 4,8 (3 объема буфера) и β-глюкуронидазу (1000 ед/мл). Гидролиз проводят 24 часа при 37°. Гидролизат экстрагируют эфиром (3 × 20 мл). Эфирные экстракты встряхивают в делительной воронке с 1 н NaOH (2 × 40 мл). NaOH-фазы объединяют, подкисляют 2 н HCl до pH 4,0, экстрагируют равным объемом хлороформа (дважды). Объединенные хлороформные фазы обезвоживают фильтрованием через безводный Na_2SO_4 и выпаривают на роторном испарителе.

При определении ДЭС в сыворотке крови гидролиз не проводят. 0,3—3,0 мл сыворотки разводят в 10 раз дистиллированной водой и экстрагируют эфиром (3 × 0,5 объема). Эфирный экстракт встряхивают в делительной воронке с 1 н NaOH (2 × 0,3 объема). NaOH-фазы объединяют и, как описано выше, подкисляют, экстрагируют хлороформом, который обезвоживают и выпаривают.

Метод определения ДЭС в жировой ткани включает на первых этапах стадию экстракции изооктаном и очистки в системе: изооктан-1 н NaOH. Гидролиз не проводят, т. к. метод рассчитан на определение неконъюгированного ДЭС.

10 г жировой ткани мелко измельчают и расплавляют прогреванием в изооктане. Полученные экстракты фильтруют на бюхнеровской воронке через бумажный фильтр. Фильтрат переносят в делительную воронку, добавляют 40 мл 1 н NaOH и встряхивают в течение 2—3 мин. NaOH-фазу подкисляют, экстрагируют хлороформом и в дальнейшем адсорбционную хроматографию и количественное измерение проводят, как изложено в основной прописи метода.

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