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 ОХРАТОКСИНА А В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ*

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-3У.

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

5. Жидкостный хроматограф высокой эффективности «Алтекс» модель 336 или дргой хроматограф с аналогичными параметрами; колонка и предколонка с силикагелем, химически связанным с октадецилсиланом, типа «Ultrasphere-ODS», с размером частиц 5 микрон; длина колонки 25 см, предколонки — 4,5 см, внутренний диаметр колонок — 0,46 см; флуоресцентный детектор «Кратос» модель FS-970 или другой детектор с аналогичными параметрами.

---

* — Методические рекомендации по обнаружению, идентификации и определению содержания охратоксина А в пищевых продуктах, утв. МЗ СССР 10 апреля 1085 г. № 3245-85

6. Микрошприц — МШ-10 на 10 мкл.
7. Стеклянные камеры для ТСХ с притертыми крышками, например, стеклянные четырехугольные сосуды 195 × 195 × 200 мм завода «Дружная горка».
8. Пластины для ТСХ «Силуфол» размером 15 × 15 см или 20 × 20 см, ЧССР.
9. Воронки делbтельные ВД2-250 по ГОСТ 8613-75.
10. Цилиндры мерные на 100 мл с притертой пробкой, тип 2-100 по ГОСТ 1770-74.
11. Колбы плоскодонные конические на 250 мл с НШ 29, тип КнКШ 250-29/32 по ГОСТ 10394—72.
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. Распылитель стеклянный с грушей.
16. Бензол «чда» по ГОСТ 5955-75.
17. Гексан «ч» по ТУ 6-09-3375-78.
18. Метанол «хч» по ГОСТ 6995-77.
19. Толуол «чда» по ГОСТ 5789-78.
20. Хлороформ для наркоза или по ГОСТ 3610-51.
21. Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат) «чда» по ГОСТ 22300-76.
22. Эфир диэтиловый медицинский по ГОСТ 6265-52.
23. Кислота муравьиная «чда» по ГОСТ 5848-73.
24. Кислота уксусная «хч» по ГОСТ 61-75.
25. Кислота серная «чда» по ГОСТ 4204-77.
26. Натрий сернокислый безводный «чда» по ГОСТ 4166-76.
27. Натрий углекислый кислый (гидрокарбонат натрия) «чда» по ГОСТ 4201-79.
28. Натрий углекислый (карбонат натрия) «чда» по ГОСТ 83-79.
29. Бумага индикаторная универсальная по ТУ 6-09-1181-76.

1. Экстракция

При отборе проб 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 25 г измельченного продукта помещают в плоскодонную коническую колбу на 250 мл, добавляют 12,5 мл 1% раствора уксусной кислоты в воде и 125 мл хлороформа. Встряхивают на аппарате для встряхивания в течение 30 минут. Полученную смесь фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерный цилиндр, отбирают 50 мл фильтрата.

2. Очистка экстракта

В делительную воронку переносят 50 мл фильтрата, добавляют 35 мл 3% раствора гидрокарбоната натрия в смеси метанол—вода (2:8). Встряхивают, после разделения слоев верхний водный слой отделяют. Нижний хлороформный слой дважды (2 × 35 мл) экстрагируют водно-метанольным раствором гидрокарбоната натрия. Объединенные водные экстракты встряхивают в делительной воронке с хлороформом (2 × 25 мл), каждый раз после разделения слоев отбрасывая нижний хлороформный слой. Водный экстракт подкисляют раствором серной кислоты в воде с концентрацией 2 моля/литре до pH 2—3 по универсальной индикаторной бумаге (примерно 9,5—10 мл раствора серной кислоты). Подкисленный водный раствор немедленно экстрагируют в делительной воронке хлороформом (1 × 50 мл и 2 × 25 мл). Объединенные хлороформные экстракты сушат безводным сернокислым натрием (10—12 г) в течение 0,5 часа. Раствор фильтруют через [имическую воронку с кусочком ваты в круглодонную колбу на 250 мл с НШ 29, сернокислый натрий промывают 15 мл хлороформа и отфильтровывают хлороформ в ту же колбу. Хлороформный раствор упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 40—45° С. Остаток растворяют в 5 мл хлороформа и фильтруют через химическую воронку со складчатым фильтром из плотной фильтровальной бумаги в грушевидную колбу на 50 мл с НШ 14,5. Круглодонную колбу споласкивают 5 мл хлороформный смыв фильтруют в ту же грушевидную колбу на 50 мл, фильтр затем промывают 2 мл хлороформа. Хлороформный раствор упаривают досуха на ротационном испарителе. Остаток растворяют в 400 мкл смеси бензол—уксусная кислота (99:1) для проведения ТСХ анализа или в 400 мкл метанола для проведения анализа с помощью ВЭЖХ (раствор А).

3. Приготовление стандартных растворов охратоксина А

Стандартный раствор охратоксина А готовят следующим образом: навеску 5 мг охратоксина А* растворяют в мерной колбе на 100 мл смесью бензол—уксусная кислота (99:1), концентрация полученного стандартного раствора примерно 50 нг/мкл. Для установления точной концентрации стандартного раствора измеряют его оптическую плотность при длине волны 330 нм (D_{330}). Кон-центрацию раствора вычисляют по формуле:

---

* — по поводу приобретения стандарта охратоксина А обращаться в Институт питания АМН СССР

$$C = \frac{Д_{330} \times 1000 \times 403{,}8}{5500} \text{ нг/мкл}$$

Стандартный раствор хранится в холодильнике при температуре ниже 0° С, срок годности стандартного раствора до 1,5 года.

Рабочий раствор охратоксина А для ТСХ готовится разбавлением стандартного раствора охратоксина в 10 раз смесью бензол—уксусная кислота (99:1) и имеет концентрацию 5 нг/мкл.

Рабочий раствор охратоксина А для ВЭЖХ готовят следующим образом: 100 мкл (0,1 мл) стандартного раствора охратоксина А с концентрацией 50 нг/мкл разбавляют метанолом до объема 5 мл, получая рабочий раствор для ВЭЖХ с концентрацией 1 нг/мкл.

4. Обнаружение и количественное определение охратоксина А с помощью ВЭЖХ

Условия ВЭЖХ: подвижная фаза — метанол—вода—уксусная кислота (75:25:1,5), скорость потока подвижной фазы — 1 мл/мин. Рекомендуется использовать перегнанный метанол и бидистиллированную воду, фильтруя их через бумажный складчатый фильтр перед использованием. Флуоресцентный детектор устанавливается на длину волны возбуждающего излучения — 330—333 нм (или устанавливается соответствующий фильтр на линии возбуждения при работе с флуоресцентным детектором без монохроматора), на линии эмиссии устанавливается эмиссионный фильтр с полосой пропускания от 415—420 нм. Входное напряжение самописца — 10 мВ, чувствительность детектора устанавливается таким образом, чтобы 5 нг охратоксина А соответствовало отклонение пера на полную шкалу самописца при уровне шума от 3 до 5% от полной шкалы. Предел обнаружения при таких условиях составляет 0,5—1 нг охратоксина А во вколе.

Для калибровки прибора в инжектор с помощью микрошприца вводится 2, 5 и 3 мкл рабочего раствора для ВЭЖХ, что соответствует 2, 5 и 3 нг охратоксина А. Для каждого количества введенного охратоксина А определяют высоту пика. При описанных выше условиях ВЭЖХ время выхода пика растворителя составляет 2,2—2,5 мин., а время выхода пика охратоксина А от 6,5 до 8,5 мин. в зависимости от небольших изменений в составе подвижной фазы и времени уравновешивания колонки.

В инжектор хроматографа вводится с помощью микрошприца 20 мкл раствора А (раствор очищенного экстракта в 400 мкл метанола). При наличии пика, совпадающего по времени выхода с охратоксином А, определяют его высоту ($h_{обр.}$).

Расчет концентрации охратоксина А в образце проводят по формуле:

$$C = \frac{V_1 \times V_3 \times m_{ст.} \times h_{обр.}}{V_2 \times V_4 \times M \times h_{ст.}} \text{ мкг/кг, где:}$$

V_1 — объем хлороформа для экстракции образца в мл (125);
V_2 — объем хлороформного фильтрата, взятый для анализа в мл (50 мл);
V_3 — объем экстракта (раствор А) в мкл (400 мкл);
V_4 — объем экстракта (раствор А), введенный в хроматограф, в мкл (20 мкл);
$m_{ст.}$ — масса стандарта охратоксина А, введенная в хроматограф, в нг;
$h_{ст.}$ — высота пика, соответствующая данной массе стандарта, в мм;
$h_{обр.}$ — высота пика охратоксина А из образца, в мм;
М — навеска образца для анализа в г (25 г).

Если пик охратоксина А в образце выходит за пределы шкалы самописца, анализ с помощью ВЭЖХ проводят повторно после разбавления раствора экстракта (раствор А) метанолом (после увеличения объема V_3).

5. Обнаружение и количественное определение охратоксина А с помощью двумерной ТСХ

Пластинку «Силуфол» размечают тонкими карандашными линиями, не повреждая слой силикагеляоа. В правом нижнем углу на расстоянии 1,5 см от краев пластинки наносят с помощью микрошприца 20 мкл раствора А (раствор экстракта в 400 мкл смеси бензол—уксусная кислота (99:1). В правом верхнем и левом нижнем углах пластинки на расстоянии 1,5 см от краев наносят по 3 мкл рабочего раствора охратоксина А для ТСХ (по 15 нг охратоксина А). Пластинку помещают в камеру для ТСХ со смесью эфир—гексан—хлороформ—муравьиная кислота (30:30:30:1) и развивают пластинку в 1-ом направлении до достижения фронтом растворителя тонкой карандашной линии, проведенной в 3 см от верхнего края пластинки. Пластинку извлекают и сушат на воздухе 5 минут. Затем проводят развитие пластинки во 2-ом направлении в системе толуол—этилацетат—муравьиная кислота (55:35:10). После достижения фронтом тонкой карандашной линии, проведенной в 3 см от верхнего края пластинки, ее извлекают из камеры и сушат на воздухе. Рассматривают пластинку в длинноволновом УФ-свете. Пятна охратоксина А флуоресцируют в этих условиях зелено-синим цветом. Пластинку опрыскивают насыщенным раствором карбоната натрия в воде и рассматривают в длинноволновом УФ-свете. Цвет флуоресценции охратоксина А должен измениться на синий. Обнаружение на пластинке пятна, соответствующего по цветам флуоресценции и хроматографической подвижности в двух системах пятнам стандарта охратоксина А, свидетельствует о наличии охратоксина А в образце.

Для количественного определения охратоксина А пластинку «Силуфол» размечают тонкими карандашными линиями. В правом нижнем углу на расстоянии 1,5 см от краев наносят 20 мкл раствора

А, в правом верхнем углу наносят 3 мкл рабочего раствора охратоксина А для ТСХ (15 нг охратоксина А). В левом нижнем углу на расстоянии 1,0; 2,0 и 3,0 см от левого края и 1,5 см от нижнего края пластинки наносят 1,3 и 5 мкл рабочего раствора охратоксина А (5, 15 и 25 нг охратоксина А соответственно). Развитие пластинок в 1-ом и 2-ом направлениях проводят как описано выше. После сушки пластинки ее опрыскивают насыщенным раствором карбоната натрия в воде и рассматривают в длинноволновом УФ-свете. Сравнивая интенсивность флуоресценции разных количеств стандарта охратоксина А с интенсивностью флуоресценции пятна охратоксина А в образце оценивают количество нг охратоксина А в нанесенном на пластинку объеме раствора А (m).

Концентрацию охратоксина А в образце рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{V_1 \times V_3 \times m}{V_2 \times V_4 \times M} \text{ мкг/кг, где:}$$

V_1 — объем хлороформа для экстракции образца в мл (125 мл);
V_2 — объем хлороформного фильтрата, взятый для анализа в мл (50 мл);
V_3 — объем экстракта (раствор А для ТСХ) в мкл (400 мкл);
V_4 — объем экстракта (раствор А), нанесенный на пластинку в мкл (20 мкл);
m — количество охратоксина А в пятне, в нг;
M — навеска образца, взятая для анализа, в г (25 г).

При проведенных в скобках объемах и навесках формула концентрации охратоксина А в образце выражается следующим образом:

$$C = 2{,}0\ m \text{ мкг/кг}$$

Если интенсивность флуоресценции пятна охратоксина А в экстракте выше интенсивности флуоресценции пятна стандарта, соответствующего 5 мкл рабочего раствора для ТСХ (25 нг охратоксина А), то на пластинку следует либо нанести меньшее количество экстракта (уменьшить объем V_4), либо разбавить раствор А смесью бензол—уксусная кислота (99:1), т. е. увеличить объем V_3, внеся соответствующие коррективы в расчетную формулу.

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