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 ДЕЗОКСИНИВАЛЕНОЛА В ЗЕРНЕ И ЗЕРНОПРОДУКТАХ*

Оборудование и материалы

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

2. Ротационный испаритель с ловушкой ИР-1М или аналогичный.

3. Мельница лабораторная электрическая ЭМ-3А по ТУ 46-22-236-79.

---

* — Методические указания по обнаружению, идентификации и определению содержания дезоксиниваленола (вомитоксина) в зерне и зернопродуктах, утв. МЗ СССР 10 октября 1985 г. №3940-85

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

5. Жидкостный хроматограф «Алтекс», модель 336 или другой хроматограф с аналогичными параметрами; колонка и предколонка с силикагелем типа «Ультрасфера-si» с размером частиц 5 мкм, длина колонки 25 см, предколонки — 4,5 см, внутренний диаметр — 0,46 см; ультрафиолетовый детектор «Кратос», модель SF-757 или другой детектор с аналогичными параметрами.

6. Микрошприц МШ-1 — на 10 мкл.

7. Стеклянные камеры для ТСХ с притертыми крышками.

8. Пластинки для ТСХ «Силуфол» размером 15 × 15 см или 20 × 20 см, ЧССР.

9. Колбы плоскодонные конические на 250 мл с НШ 29, тип КнКШ 250-29/32 по ГОСТ 10394-74.

10. Цилиндры мерные на 100 мл с притертой пробкой, тип 2-100 по ГОСТ 1770-74.

11. Колбы грушевидные на 50 мл с НШ 14,5, тип ГрКШ-50-14/23 по ГОСТ 10394-74.

12. Распылитель стеклянный с грушей.

13. Стандартный раствор дезоксиниваленола в смеси бензол—ацетонитрил (5:1) с концентрацией 25 нг/мкл (по поводу получения стандартного раствора обращаться в Институт питания АМН СССР).

14. Ацетонитрил, ч. по ТУ 6-09-3534-74.

15. Ацетон. ч.д.а. по ГОСТ 2603-79.

16. Эфир диэтиловый, медицинский по ГОСТ 6265-52.

17. Кислота уксусная, ч.д.а. по ГОСТ 61-75.

18. Бензол, ч.д.а. по ГОСТ 5955-75.

19. Гексан, ч. по ТУ 6-09-3375-78.

20. Изопропиловый спирт (пропанол-2), х.ч. по ТУ 6-09-402-76.

21. Спирт этиловый — ректификат по ТУ 6-09-1710-77.

22. Хлороформ для наркоза или по ГОСТ 3610-51.

23. Алюминия окись нейтральная для хроматографии по Брокману II, «Реанал» номер по каталогу 01125 (Венгрия) или алюминия окись для хроматографии по ТУ 6-09-3916-75.

24. Уголь активированный Р.72.270.3.

25. Колонка стеклянная хроматографическая 220 × 15 мм.

26. Метанол. ч.д.а. по ГОСТ 6995-77.

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 мин. в лабораторной мельнице или кофемолке. Навеску 25 г измельченного зерна или муки помещают в плоскодонную коническую колбу на 250 мл, добавляют 20 мл воды и затем 105 мл ацетонитрила. Встряхивают

на аппарате для встряхивания проб и в течение 30 минут. Полученную смесь фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерный цилиндр.

2. Очистка экстракта

В стеклянную хроматографическую колонку на дно помещают кусочек ваты, насыпают 0,75 г окиси алюминия и сверху — слой 0,75 г активированного угля, предварительно растертого в ступке. Над слоем угля помещают кусочек ваты. Наливают в колонку 25 мл экстракта, соответствующие 5 г исходного образца (при анализе кукурузы наливают 15 мл экстракта, соответствующие 3 г исходного образца). Отбирают элюат и, не давая колонке просохнуть, добавляют еще 10 мл смеси ацетонитрил—вода (84:16). Соединенные элюаты фильтруют через бумажный складчатый фильтр в грушевидную колбу на 50 мл, бумажный фильтр промывают 5—10 мл изопропилового спирта в ту же колбу. Фильтрат упаривают на ротационном испарителе до объема 5—7 мл. Добавляют 20 мл изопропилового спирта и повторно упаривают на ротационном испарителе досуха. Остаток в колбе после упаривания не должен содержать капель воды. Остаток растворяют в 200 мкл смеси хлороформ—ацетонитрил (4:1) — раствор А.

3. Обнаружение и количественное определение дезоксиниваленола с помощью ТСХ

На пластинке «Силуфол» проводят тонкую карандашную линию в 1,5—2 см от нижнего края пластинки. На эту линию на расстоянии 2 см друг от друга наносят с помощью микрошприца 2, 5, 10 и 20 мкл раствора А. Между пятнами экстракта на расстоянии 1 см от них на ту же линию наносят 2, 4, 6 мкл стандартного раствора дезоксиниваленола (50, 100 и 150 нг дезоксиниваленола соответственно). Пластинку помещают в камеру для ТСХ и развивают в системе хлороформ—ацетон—изопропиловый спирт (78:22:10) на расстоянии 10 см. Пластинку извлекают, сушат на воздухе 3—4 мин. и опрыскивают 10%-ным раствором хлористого алюминия в этиловом спирте. Пластинку нагревают в сушильном шкафу в течение 5—7 мин. при 105° С, затем рассматривают в длинноволновом УФ-свете. Дезоксиниваленол проявляется в виде пятен с синей флуоресценцией и хроматографической подвижностью (R_f) 0,4—0,5. Наличие в экстракте пятен, соответствующих по цвету флуоресценции и хроматографической подвижности стандарту дезоксиниваленола, свидетельствует о загрязнении образца дезоксиниваленолом.

Для количественного определения сравнивают интенсивность флуоресценции разных количеств стандарта дезоксиниваленола с

интенсивностью флуоресценции его пятен в образце, приблизительно оценивая количество нг дезоксиниваленола в нанесенных на пластинку объемах раствора.

Концентрацию дезоксиниваленола в образце рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{V_1 \times m}{V_2 \times 5000}$$ мг/кг, где:

V_1 — объем раствора А в мкл (200 мкл);
V_2 — объем раствора А, нанесенный на пластинку в мкл;
m — количество нг дезоксиниваленола в V_2 мкл раствора А, оцененное визуальным сравнением со стандартом на ТСХ-пластинке.

Если интенсивность флуоресценции пятна дезоксиниваленола в экстракте выше интенсивности флуоресценции пятна дезоксиниваленола, соответствующего 6 мкл стандартного раствора, то следует разбавить раствор А, т. е. увеличить объем V_1, внеся соответствующие коррективы в расчетную формулу.

4. Обнаружение и количественное определение дезоксиниваленола с помощью ВЭЖХ

Условия ВЭЖХ: подвижная фаза гексан—изопропиловый спирт—вода (75:25:1,5), скорость подвижной фазы 1,2 мл/мин. Рекомендуется использовать перегнанные растворители, фильтруя их через бумажный складчатый фильтр перед использованием. УФ-детектор устанавливается на длину волны 224 нм, шкала чувствительности 0,005. Входное напряжение самописца 10 мВ.

Для калибровки прибора в инжектор с помощью микрошприца вводят 2 и 4 мкл стандартного раствора, что соответствует 50 и 100 нг дезоксиниваленола. Для каждого количества стандарта определяют высоту пика на хроматограмме. При описанных выше условиях ВЭЖХ время выхода пика дезоксиниваленола составляет от 12 до 14 мин. в зависимости от изменений в составе подвижной фазы.

В инжектор хроматографа вводится 10 мкл раствора А. При наличии пика, совпадающего по времени выхода со стандартом, определяют его высоту ($h_{обр.}$).

Расчет концентрации дезоксиниваленола в образце проводят по формуле:

$$C = \frac{V_1 \times m \times h_{обр.}}{V_2 \times 5000 \times h_{ст.}}$$ мг/кг, где:

V_1 — объем раствора А, в мкл (200 мкл);
V_2 — объем раствора А, внесенный в хроматограф, в мкл (10 мкл);
m — масса стандарта дезоксиниваленола, введенная в хроматограф, в нг;
$h_{ст.}$ — высота пика, соответствующая данной массе стандарта, в мм;

$h_{обр.}$ — высота пика дезоксиниваленола из образца, в мм.

Если пик дезоксиниваленола в образце выходит за пределы шкалы самописца, анализ проводят повторно после разбавления раствора А смесью хлороформ—ацетонитрил (4:1), т. е. после увеличения объема V_1.

5. Подтверждение наличия и количественное определение дезоксиниваленола с помощью двумерной ТСХ

Пластинку «Силуфол» размечают тонкими карандашными линиями, не повреждая слоя силикагеля. В правом нижнем углу на расстоянии 1,5 см от краев пластинки наносят с помощью микрошприца 20 мкл раствора А. В правом верхнем и левом нижнем углах пластинки на расстоянии 1,5 см от краев наносят 2, 3, 4 и 5, 6 мкл стандартного раствора дезоксиниваленола соответственно. Пластинку помещают в камеру для ТСХ со смесью эфир—метанол—вода—бензол (90:3:0,5:3) и развивают пластинку в первом направлении до достижения фронтом растворителя тонкой карандашной линии, проведенной в 4 см от верхнего края пластинки. Пластинку извлекают и сушат на воздухе 5 мин. Затем проводят развитие пластинки во 2-ом направлении в системе хлороформ—ацетон—изопропиловый спирт (78:12:10). После достижения фронтом растворителя карандашной линии, проведенной в 4 см от верхнего края пластинки, ее извлекают из камеры и сушат на воздухе. Обнаружение и количественное определение дезоксиниваленола проводят аналогично п. 3.

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