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 ЗЕАРАЛЕНОНА 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-ЗУ.
4. Насос водоструйный по ГОСТ 10696-75.
5. Весы технические по ГОСТ 19491-74.
6. Баня водяная с электронагревателем.
7. Прибор для флуоресцентного анализа витаминов в растворе (модель 833) ТУ 64-1-1080-78 или диагностическая лампа ОЛД-41.
8. Микрошприц МШ-10 на 10 мкл или калиброванные стеклянные капилляры на 5—10 мкл.
9. Камеры для ТСХ с притертыми крышками, например, стеклянные четырехугольные сосуды 195 × 195 × 200 мм завода «Дружная горка».
10. Пластины для ТСХ «Силуфол» размером 15 × 15 см, ЧССР.
11. Воронки делительные ВД2-250 по ГОСТ 8613-75.
12. Цилиндры мерные на 100 мл с притертой пробкой, тип 2-100 по ГОСТ 1770-74.
13. Колбы плоскодонные конические на 250 мл с НШ 29, тип КнКШ 250-29/32 по ГОСТ 10394-72.
14. Колбы круглодонные на 250 мл с НШ 29, тип ККШ 250-29/32 по ГОСТ 10394-72.
15. Колбы грушевидные на 50 мл с НШ 14,5; тип ГрКШ 50-14/23 по ГОСТ 10394-72.
16. Колбы мерные на 100 мл, тип 2-100-2 по ГОСТ 1770-74.
17. Распылитель стеклянный с грушей.
18. Зеараленон кристаллический, номер по каталогу 38562, фирма «Серва», ФРГ (по поводу приобретения стандарта зеараленона обращаться в Институт питания АМН СССР).
19. Ацетонитрил. ч. по ТУ 6-09-3534-74.
20. Ацетон, ч.д.а. по ГОСТ 2603-79.
21. Бензол, ч.д.а. по ГОСТ 5955-75.
22. Гептан, ч.д.а. по ГОСТ 5.395-70 или гексан, ч. по ТУ 6-09-3375-78.
23. Толуол, ч.д.а. по ГОСТ 5789-78.
24. Хлороформ для наркоза или по ГОСТ 3610-51.
25. Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат), ч.д.а. по ГОСТ 22300-76.

---

* — Методические рекомендации по обнаружению, идентификации и определению содержания зеараленона в пищевых продуктах, утв, МЗ СССР 23.01.84 № 2964-84

26. Этанол по ТУ 6-09-1710-77.
27. Кислота муравьиная, ч. по ГОСТ 5848-73.
28. Кислота уксусная, ч.д.а. по ГОСТ 61-75.
29. Калий хлористый, ч.д.а. по ГОСТ 4234-77.
30. Алюминий хлористый, 6-водный, ч.д.а. по ГОСТ 3759-75.
31. Натрий сернокислый, безводный, ч.д.а. по ГОСТ 4166-76.
32. Натрий углекислый, ч.д.а. по ГОСТ 83-79.
33. Прочный синий В — соль (диазоль синий С) для гистологии, номенклатурный номер 550092 по «Каталогу — заявке на импортные химические реактивы и препараты», Союзреактив, 1982 г. (производство «Хемапол», ЧССР).

1. Экстракция

При отборе проб 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 минут в кофемолке или лабораторной мельнице. Навеску 20 г измельченного продукта помещают в плоскодонную коническую колбу на 250 мл, добавляют 10 мл 4% раствора хлористого калия и 90 мл ацетонитрила. Встряхивают на аппарате для встряхивания в течение 30 минут. Полученную смесь фильтруют через бумажный складчатый фильтр в мерный цилиндр, отбирают 70 мл фильтрата.

2. Очистка экстракта

В делительную воронку на 250 мл или 500 мл переносят 70 мл фильтрата, добавляют 70 мл гептана (или гексана). Встряхивают, после разделения слоев верхний гептановый слой отбрасывают. Нижний ацетонитрильный слой дважды встряхивают с 50 мл гептана, каждый раз отбрасывая верхний гептановый слой. Ацетонитрильный слой разбавляют 10 мл хлороформа и сушат безводным сернокислым натрием (10—15 г) в течение 0,5 часа. Раствор фильтруют через химическую воронку с кусочком ваты в круглодонную колбу на 250 мл с НШ 29. Сернокислый натрий промывают 10 мл хлороформа и отфильтровывают хлороформ в ту же круглодонную колбу. Упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 45°. Остаток растворяют в 5 мл бензола и переносят в грушевидную колбу на 50 мл с НШ 14,5. Круглодонную колбу на 250 мл еще дважды споласкивают 5 мл бензола, бензольный раствор преносят в ту же грушевидную колбу на 50 мл. Бензольный раствор упаривают на ротационном испарителе досуха, остаток растворяют в 200 мкл бензола (раствор А).

3 Обнаружение и идентификация зеараленона

3.1. Приготовление стандартного раствора зеараленона

Стандартный раствор зеараленона готовят следующим образом: навеску 1 мг кристаллического зеараленона помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки бензолом. Концентрация зеараленона в стандартном растворе составляет 10 нг/мкл или 10 мкг/мл. Раствор хранят в холодильнике при температуре не выше +5°. Срок годности стандартного раствора — до 1 года.

3.2. Обнаружение зеараленона с помощью двумерной ТСХ

Пластинку «Силуфол» размером 15 × 15 см размечают тонкими карандашными линиями. В правом нижнем углу на расстоянии 1,5 см от краев пластинки наносят с помощью микрошприца или стеклянного калиброванного капилляра 10 мкл раствора А. Пластинку помещают в камеру для ТСХ со смесью гексан—бензол (1:1). Развитие пластинки проводят в 1-ом направлении. После достижения фронтом растворителя верхнего края пластинки, пластинку оставляют в камере еще 15 минут. Пластинку извлекают и сушат на воздухе 5 минут. В правом верхнем углу на расстоянии 1,5 см от краев пластинки наносят 5 мкл стандартного раствора зеараленона и помещают ее в камеру для ТСХ со смесью гексан—ацетон (7:3). Развитие хроматограммы проводят во 2-ом направлении. После достижения фронтом растворителя верхнего края пластинки, ее оставляют в камере еще на 15 минут. Пластинку извлекают и сушат на воздухе 5 минут. В левом нижнем углу на расстоянии 1,5 см от краев пластинки наносят с помощью микрошприца 5 мкл стандартного раствора зеараленона. Проводят развитие пластинки в 1-ом направлении в камере для ТСХ со смесью толуол—этилацетат—хлороформ — 85% муравьиная кислота (45:25:25:5). После достижения фронтом растворителя тонкой карандашной линии, проведенной в 3 см от верхнего края пластинки, ее извлекают и сушат до исчезновения запаха растворителей (можно в струе теплого воздуха).

Для обнаружения пятен зеараленона на пластинке используют опрыскивание раствором прочной синей В-соли. Раствор для обнаружения готовят следующим образом: навеску 1 г прочной синей В-соли переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят до метки дистиллированной водой и добавляют 0,05 мл уксусной кислоты, при этом получается раствор светло-желтого цвета. Раствор можно хранить при температуре не выше +5° в течение 1 недели. Критерием непригодности раствора для обнаружения зеараленона является изменение окраски раствора с желтой на красно-коричневую.

Пластинку опрыскивают полученным 1% раствором прочной синей В-соли, сразу после этого опрыскивают 5% раствором углекислого натрия до появления красно-бордовой окраски пятен стандарта зеараленона. Обнаружение на пластинке пятна, соответствующего по цвету и хроматографической подвижности в 2 направлениях стандартам зеараленона, свидетельствует о наличии зеараленона в анализируемом образце.

3.3. Подтверждение наличия зеараленона в образце

Если на пластинке, обработанной по п. 3.2 обнаружено пятно, соответствующее зеараленону, необходимо провести подтверждение наличия зеараленона. Для этого на пластинку наносят раствор А и стандарты зеараленона и проводят развитие хроматограммы в 2-х направлениях аналогично п. 3.2. Высушенную пластинку опрыскивают 20% раствором хлорида алюминия в этиловом спирте. Пластинку помещают в сушильный шкаф и выдерживают 10 минут при 100—105°. Рассматривают пластинку в длинноволновом УФ-свете. Пятна стандартов зеараленона флуоресцируют в этих условиях синим цветом. Обнаружение на пластинке пятна, соответствующего по цвету флуоресценции и хроматографической подвижности пятнам стандартов зеараленона, подтверждает наличие зеараленона в образце.

4. Количественное определение зеараленона

Если в экстракте обнаружено и подтверждено наличие зеараленона, то необходимо провести количественное определение. Пластинку «Силуфол» 15 × 15 см размечают тонкими карандашными линиями. В правом нижнем углу пластинки на расстоянии 1,5 см от краев наносят с помощью микрошприца 10 мкл раствора А (если на пластинке, обработанной согласно п. 3.2, обнаружены пятна зеараленона с интенсивностью окраски, намного превышающей интенсивность окраски, соответствующей 5 мкл стандартного раствора, следует предварительно разбавить раствор А бензолом в 3 и более раз). Затем пластинку развивают в 1 направлении в смеси гексан—бензол (1:1) по п. 3.2. Пластинку извлекают и сушат на воздухе. В правом верхнем углу на расстоянии 1,5 см от краев наносят 5 мкл стандартного раствора зеараленона и помещают пластинку в камеру для ТСХ со смесью гексан—ацетон (7:3). Проводят развитие пластинки во 2-ом направлении как описано в п. 3.2. Пластинку извлекают и сушат на воздухе. 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 2,0; 4,0 и 6,0 мкл стандартного раствора зеараленона, соответственно. Пластинку помещают в камеру для ТСХ со смесью толуол—этилацетат—хлороформ—85% муравьиная кислота (45:25:25:5) и развивают хроматограмму в 1-ом направлении до

достижения фронтом растворителя карандашной линии, проведенной в 3 см от верхнего края пластинки. Пластинку извлекают из камеры, сушат и опрыскивают раствором прочной синей В-соли как описано в п. 3.2. Сравнивая интенсивность окраски разных количеств стандарта зеараленона с интенсивностью окраски пятна зеараленона в экстракте (раствор А), определяют количество нанограмм (нг) зеараленона в экстракте.

Содержание зеараленона в образце рассчитывают по формуле:

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

C — концентрация зеараленона в образце, в мкг/кг;
V_1 — объем водно-ацетонитрильной смеси для экстракции в мл (100 мл);
V_2 — объем водно-ацетонитрильного фильтрата, взятый для анализа в мл (70 мл);
V_3 — объем очищенного экстракта перед ТСХ (раствор А) в мкл 200 мкл);
V_4 — объем очищенного экстракта (раствор А), наносимый на пластинку, в мкл (10 мкл);
M — навеска образца, взятая для анализа, в г (20 г);
m — количество зеараленона в пятне экстракта, в нг.

При приведенных в скобках объемах и навесках формула содержания зеараленона выражается следующим образом:

$$C = 1{,}43\ m \text{ мкг/кг}$$

Если интенсивность окраски пятна зеараленона в экстракте выше интенсивности окраски пятна стандарта, соответствующего 6 мкл стандартного раствора (60 нг зеараленона), то на пластинку либо наносить меньшее количество экстракта (уменьшить объем V_4), либо разбавить раствор А бензолом (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