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 СОДЕРЖАНИЯ ПАТУЛИНА В ФРУКТОВЫХ И ОВОЩНЫХ СОКАХ И ПЮРЕ*

Оборудование и материалы

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

2. Ротационный испаритель с ловушкой по ТУ 25-11-917-76 (завод «Химлабприбор»).

3. Насос водоструйный по ГОСТ 10696-75.

4. Весы технические по ГОСТ 19491-74.

5. Баня водяная с электронагревателем.

6. Прибор для флуоресцентного анализа витаминов в растворе (модель 833) МРТУ 64-1-1080-63 или диагностическая лампа ОЛД-41.

7. Микрошприц МШ-10 на 10 мкл или калиброванные стеклянные капилляры.

8. Камеры для ТСХ с притертыми крышками, например, стеклянные четырехугольные сосуды 195 × 195200 мм завода «Дружная горка».

9. Пластины для ТСХ «Силуфол» размером 15 × 15 см, ЧССР.

---

* — Методические рекомендации по обнаружению, идентификации и определению содержания патулина в фруктовых и овощных соках и пюре, утв. МЗ СССР 30.12.82 № 2655-82

10. Силикагель для колоночной хроматографии с размером частиц 100—250 микрон (силикагель Л), ЧССР.
11. Распылитель стеклянный с грушей.
12. Пленка целлофановая по ГОСТ 7730—74 (без нитроцеллюлозного покрытия).
13. Цилиндры мерные на 50 и 100 мл с притертой пробкой.
14. Колбы плоскодонные конические на 250 и 500 мл с НШ 29.
15. Колбы круглодонные на 500 мл с НШ 29.
16. Колбы грушевидные с НШ 14,5 на 50—60 мл.
17. Колбы мерные на 100 мл по ГОСТ 1770—74.
18. Колонка стеклянная хроматографическая 300 × 15 мм.
19. Патулин кристаллический.
20. Этиловый эфир уксусной кислоты (этилацетат) по МРТУ 6-06-6515-70.
21. Толуол по ГОСТ 5789-69.
22. Гексан по ТУ 6-09-3375-78.
23. Хлороформ медицинский или по ГОСТ 3160-51 «ХЧ».
24. Ацетон по ГОСТ 2603-71.
25. Бензол по ГОСТ 5955-75.
26. Ацетонитрил по ТУ 6-09-3534-74.
27. Кислота муравьиная по ГОСТ 5948-60.
28. Кислота соляная по ГОСТ 3118-67.
29. Бензидиновый раствор для опрыскивания ТСХ-пластинок, готовится растворением 1 г бензидина (производства ВНР, завод «Реанал») в смеси 200 мл 85%-ной муравьиной кислоты и 0,95 мл концентрированной соляной кислоты.
30. Калий марганцевокислый по ГОСТ 20490-75.
31. Натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4166-76, прокаленный.
32. Натрий хлористый по ГОСТ 4233-66.
33. Аскорбиновая кислота.

1. Подготовка пробы для анализа

При отборе проб для анализа следует руководствоваться требованиями ГОСТ 8756.0-70 «Пищевые продукты консервированные. Отбор проб и подготовка их к испытанию» и ГОСТ 12430-66 «Сельскохозяйственная продукция. Методы отбора образцов при карантинном досмотре и экспертизе». При анализе соков и пюре размер среднего образца, из которого отбирается проба для анализа, не должен быть менее 1 литра. Отбор пробы проводят из све-жеприготовленных банок, перед отбором пробы сок или пюре тщательно перемешивают до получения однородной массы. В случае необходимости анализа фруктов или овощей из них следует по-лучить сок с помощью соковыжималки любого типа с тем, чтобы объем среднего образца сока был не менее 1 литра.

2. Предварительная очистка пробы (диализ) и экстракция

К 20 мл сока добавляют 20 мг аскорбиновой кислоты (к 10 мл пюре добавляют 10 мл дистиллированной воды и 20 мг аскорбиновой кислоты), выливают в целлофановый мешочек для диализа, приготовленный из листа целлофана размером 30 × 30 см. Закрепляют мешочек в плоскодонной конической колбе на 250 мл с НШ 29 (или на 500 мл с НШ 29), в которую предварительно добавляют 200 мл 10%-ного раствора хлористого натрия в воде. Колбу встряхивают в течение 4 часов в аппарате для встряхивания проб. Мешочек извлекают из колбы, водный раствор из колбы переносят в делительную воронку на 500 мл, добавляют 100 мл этилацетата. Встряхивают, после разделения слоев верхний этилацетатный раствор отделяют. Нижний водный слой экстрагируют в делительной воронке этилацетатом (3 × 50 мл). Соединенные этилацетатные экстракты сушат сернокислым натрием (10—15 г) в течение 1 часа. Сухой этилацетатный раствор фильтруют через химическую воронку с кусочком ваты в круглодонную колбу на 500 мл с НШ 29. Сернокислый натрий промывают 20—25 мл этилацетата и отфильтровывают этилацетат в ту же круглодонную колбу. Добавляют 1 г (2 мл) силикагеля и упаривают досуха (до консистенции пересыпающегося сухого порошка силикагеля) на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 40°.

3. Очистка экстракта с помощью колоночной хроматографии

На дно стеклянной колонки помещают кусочек ваты, наливают суспензию 2 г (4 мл) силикагеля в 20 мл толуола. Дают толуолу стечь, затем, не допуская просыхания колонки, добавляют 20 мл толуола и высыпают в колонку из круглодонной колбы силикагель с адсорбированным экстрактом. Дают толуолу стечь и элюируют колонку 100 мл толуола, толуольные элюаты отбрасывают. Круглодонную колбу споласкивают 5 мл смеси гексан-этилацетат (2:3) и выливают раствор в колонку, добавляют 100 мл смеси гексан-этилацетат (2:3), элюат отбирают в круглодонную колбу на 500 мл с НШ 29. Упаривают на ротационном испарителе до объема примерно 10 мл. Упаренный элюат количественно переносят в грушевидную колбу на 50—60 мл с НШ 14,5 и отростком. Круглодонную колбу споласкивают этилацетатом (2 × 5 мл) и добавляют этилацетат к экстракту в грушевидной колбе. Упаривают на ротационном испарителе до объема 0,2 мл (на цилиндрическом отростке должна быть проведена метка на уровне 0,2 мл, для чего колбу предварительно калибруют с помощью пипетки на 0,2 мл) при температуре бани

не выше 40°. Полученный раствор анализируют с помощью двумерной ТСХ (раствор А).

4. Обнаружение и идентификация патулина

4.1. Приготовление стандартного раствора патулина

Стандартный раствор патулина готовят следующим образом: навеску 1 мг кристаллического патулина помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки смесью бензол-ацетонитрил (9:1). Концентрация патулина 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 6 месяцев.

4.2. Обнаружение патулина 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 20 мкл раствора А. В правом верхнем и левом нижнем углах на расстоянии 1,5 см от краев пластинки наносят по 4 мкл стандартного раствора патулина. Пластинку помещают в камеру для ТСХ, в которую предварительно наливают смесь хлороформ-ацетон-85%-ная муравьиная кислота (80:15:5), уровень растворителя должен быть примерно на 1 см ниже нанесенных пятен. Развитие хроматограммы проводят в первом направлении до достижения фронтом растворителя карандашной линии, проведенной в 3 см от верхнего края пластинки, затем пластинку извлекают из камеры и сушат 5 минут на воздухе. Высушенную пластинку поворачивают на 90° по часовой стрелке и помещают в камеру для ТСХ со смесью толуол-этилацетат-85%-ная муравьиная кислота (50:40:10). Проводят развитие пластинки во 2-м направлении до достижения фронтом растворителя карандашной линии, проведенной в 3 см от верхнего края пластинки. Пластинку извлекают и сушат до исчезновения запаха растворителей (можно в струе теплого воздуха). Для обнаружения пятен патулина пластинку помещают в камеру с хлором на 15—20 минут. Атмосферу хлора в камере создают, помещая в камеру химический стакан или плоскодонную коническую колбу, в которой смешивают 50 мл 5%-ного водного раствора марганцевокислого калия и 50 мл 25%-ной соляной кислоты. Смешивание растворов марганцевокислого калия и соляной кислоты и помещение пластинки в камеру с хлором следует проводить в вытяжном шкафу, работая в резиновых перчатках. После извлечения пластинки из камеры с хлором ее оставляют в вытяжном шкафу на 10—15 минут для полного удаления остатка хлора с пластинки. Затем пластинку опрыскивают 0,5%-ным раст-

вором гидрохлорида бензидина в 85%-ной муравьиной кислоте. Примерно через 20 минут пластинку рассматривают в длинноволновой УФ-свете (лампа ОЛД-41 или прибор для флуоресцентного анализа витаминов, модель 833). Патулин проявляется в виде пятен с желтой флуоресценцией. Обнаружение на пластинке пятна, соответствующего по цвету флуоресценции и хроматографической подвижности пятнам стандартов патулина, свидетельствует о наличии патулина в анализируемом продукте.

5. Количественное определение патулина

Если в экстракте обнаружено наличие патулина, то необходимо провести количественное определение. Пластинку «Силуфол» размером 15 × 15 см размечают карандашными линиями. В правом нижнем углу пластинки на расстоянии 1,5 см от краев наносят с помощью микрошприца 20 мкл раствора А. В правом верхнем углу на расстоянии 1,0; 2,0 и 3,0 см от верхнего края пластинки и 1,5 см от правого края пластинки наносят соответственно 2,0; 4,0 и 6,0 мкл стандартного раствора патулина. В левом нижнем углу на расстоянии 1,5 см от краев наносят 3 мкл стандартного раствора патулина. Двумерную ТСХ и обнаружение патулина проводят аналогично п. 4.2. Сравнивая интенсивность флуоресценции разных количеств стандарта патулина с интенсивностью флуоресценции пятна патулина в экстракте (растворе А), определяют количеством нанограмм (нг) патулина в пятне экстракта.

Содержание патулина в соке (или пюре) рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{V_1 \cdot m}{V_2 \cdot V} \text{ мкг/л, где}$$

C — концентрация патулина в соке (пюре), в мкг/л;
V_1 — объем очищенного раствора экстракта в этилацетате перед ТСХ (раствор А), в мкл (200 мкл);
V_2 — объем раствора экстракта, наносимый на пластинку, в мкл (20 мкл);
V — объем сока (пюре), взятый для анализа, в мл (20 мл для сока, 10 мл для пюре);
m — количество патулина в пятне экстракта, в нг.

При приведенных в скобках объемах формула содержания патулина выражается следующим образом:

$$C = 0{,}5\ m \text{ мкг/л (для сока) и}$$

$$C = 1{,}0\ m \text{ мкг/л (для пюре).}$$

Если интенсивность флуоресценции патулина в пятне экстракта выше интенсивности флуоресценции пятна стандарта, соответствующего 6 мкл стандартного раствора (60 нг патулина), то на пластинку следует наносить меньший объем экстракта V_2,

например, 5 или 10 мкл. Если и в этом случае интенсивность флуоресценции пятна патулина в экстракте выше, чем у пятна, соответствующего 6 мкл стандартного раствора патулина, то следует разбавить раствор А этилацетатом, т. е. увеличить объем V_1 до 400 и более мкл.

Примечание: В случае превышения ПДК патулина в фруктовых и овощных соках и пюре, но не более чем в 2 раза, эти продукты могут быть использованы в условиях максимального рассредоточения. Превышение ПДК патулина в продуктах детского питания не допускается. Вопросы об использовании продуктов с содержанием патулина, превышающим допустимые концентрации более чем в 2 раза, в конкретных случаях должны решаться местными учреждениями санэпидслужбы.

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