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 АФЛАТОКСИНОВ В ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ*

Оборудование и материалы

1. Весы технические по ГОСТ 19491-74;
2. Аппарат для встряхивания жидкостей АВУ-6С по ТУ 264-1-2451-78.
3. Микроразмельчитель тканей (тип РТ-2) (Одесский экспериментальный завод «ЭМА»).
4. Баня водяная с электронагревателем МРТУ 42-886-63.
5. Лабораторный автотрансформатор (ЛАТР).
6. Мясорубка.
7. Стеклянная четырехугольная камера для тонкослойной хроматографии (240 × 210 × 100 мм) с притертой крышкой завода «Дружная горка», ст. Сиверская, Ленинградская область.
8. Прибор для флуоресцентного анализа витаминов в растворе (модель 833 МРТУ 64-1-1080-63 или аппарат ВИО-1 с фильтром УФС-6).
9. Насос водоструйный лабораторный стеклянный по ГОСТ 10696-75.
10. Ротационный испаритель по ТУ 25-11-917-76 (завод «Химлабприбор»).
11. Распылитель стеклянный с грушей.
12. Термометр 0-100°
13. Воронка Бюхнера.
14. Колонка хроматографическая (300 × 20 мм), снабженная на выходе пористым стеклянным фильтром и краном.
15. Колба Бунзена на 500 мл.
16. Пипетка Пастера.
17. Микрошприц МШ-10.
18. Цилиндры 2-50, 2-100, 2-250, 2-500 по ГОСТ 1770-74.
19. Чашка фарфоровая на 300 мл.

---

* — Методические рекомендации по количественному контролю за содержанием афлатоксинов в продуктах животного происхождения, утв. МЗ СССР 11.10.85 г. № 3942-85

20. Воронка стеклянная с диаметром 75 мм по ГОСТ 8613-75.
21. Колбы плоскодонные конические на 250, 500 мл.
22. Колбы мерные 2-20, 2-100, 2-250 по ГОСТ 1770-74.
23. Делительные воронки на 500 мл по ГОСТ 8613-75.
24. Ножницы.
25. Бумага фильтровальная (мягкая, для грубых осадков).
26. Пластина для ТСХ «Силуфол» 15 × 15 см (ЧССР).
27. Пипетка измерительная на 0,2; 5; 10 мл по ГОСТ 20292-74Е.
28. Силикагель ЛСЛ 100-250 мкм (ЧССР).
29. Колба круглодонная коническая на 500 мл.
30. Натрий сернокислый безводный по ГОСТ 4166-76.
31. Хлороформ медицинский или по ГОСТ 3160-51.
32. Гексан по ТУ 6-09-3375-74.
33. Метиловый спирт по ГОСТ 6995-77.
34. Вода дистиллированная.
35. Натрий хлористый по ГОСТ 4233-77.
36. Лимонная кислота по ГОСТ 3652-59.
37. Свинец уксуснокислый по ГОСТ 1027-67.
38. Сернокислый аммоний по ГОСТ 3769-78.
39. Бензол для криоскопии или по ГОСТ 5955-75.
40. Ацетонитрил по ТУ 6-09-3534-74.
41. Эфир диэтиловый медицинский по ГОСТ 6265-74.
42. Йод кристаллический ГОСТ 4159-79.
43. Уксусная кислота (ледяная) по ГОСТ 61-75.
44. Азотная кислота по ГОСТ 4461-77.
45. Трифторуксусная кислота по МРТУ 6-09-4769-61.
46. Ацетон по ГОСТ 2603-79.

НЕКОТОРЫЕ ОБЩИЕ УСЛОВИЯ И ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА РЕЗУЛЬТАТ АНАЛИЗА

Ряд факторов могут влиять на результат анализа. К ним относится чистота растворителя и посуды, тщательность калибровки и соблюдение условий хранения, характер освещенности в лабораторной комнате и др.

Для получения точных результатов необходимо использовать органические растворители и реактивы самой высокой чистоты. Растворители, длительное время хранившиеся в пластмассовых емкостях, нельзя использовать ввиду возможного их загрязнения.

Посуда, находившаяся в контакте с афлатоксином, подлежит тщательной обработке путем погружения на 12 часов в специальный деконтаминационный раствор следующего состава: 2,5 кг NaOH, 1 кг хлорамина, 100 г стирального порошка, 50 л воды. После такой деконтаминации посуду моют общепринятым способом.

ОТБОР ПРОБ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Отбор проб продуктов животного происхождения рекомендуется проводить с использованием действующей в настоящее время нормативно-технической документацией на конкретный вид продукта, при определении количества отбираемого образца нужно учитывать особенности каждого продукта. Свежее мясо, субпродукты (печень, почки и др.), колбасы и другие готовые мясные изделия рекомендуется брать в количестве 50 г, молоко, кефир и другие жидкие молочные продукты — 50 мл, сухое молоко — 5 г (растворить в 45 мл воды), плотные молочные продукты — 50 г. Пробы подлежат немедленному анализу с целью получения данных, точно характеризующих партии продукта в момент контроля.

Указанные навески мяса, мясных изделий, других плотных продуктов разрезают ножом или ножницами на мелкие кусочки, дважды пропускают через мясорубку, затем тщательно гомогенизируют в размельчителе тканей в 40 мл насыщенного раствора лимоннокислого натрия*. Для молока, жидких продуктов и биологических сред процесс размельчения исключается.

ЭКСТРАКЦИЯ И ОЧИСТКА

Гомогенат переносят в 500 мл колбу, добавляют 150 мл охлажденного метанола, встряхивают 30 мин. Затем смесь фильтруют через Бюхнеровскую воронку с широкопористой фильтровальной бумагой в колбу Бунзена на 500 мл под вакуумом. Фильтр с осадком осторожно переносят обратно в 500 мл колбу, заливают 60 мл водяного метанола**, встряхивают 15 минут и фильтруют. 150 мл объединенного фильтрата переносят в 500 мл колбу, добавляют 10 мл раствора ацетата свинца***, 5 г сульфата аммония в 75 мл воды, тщательно перемешивают и помещают в водяную баню при 50° С на 15 минут. После встряхивания в течение 20 минут смесь фильтруют через бумажный складчатый фильтр в 250 мл градуированный цилиндр и 160 мл фильтрата переносят в 500 мл делительную воронку. К фильтрату добавляют 50 мл гексана или петролейного эфира, встряхивают 1 минуту и после разделения нижний водно-метаноловый слой переливают в другую делительную воронку на 500 мл. Процедуру повторяют дважды. Затем добавляют 50 мл хлороформа, встряхивают 1 минуту и, после разделения, нижний хлороформный слой сливают в круглодонную колбу с притертой пробкой на 500 мл. Процедуру пов-

---

* — готовят следующим образом: в 100 мл дистиллированной воды растворяют 40 г натрий хлор 4,8 г лимонной кислоты, перемешивают, подогревая

** — раствор содержит на 100 мл: 50 мл метанола и 50 мл насыщенного раствора лимоннокислого натрия

*** — в 1 л воды содержится 150 г уксуснокислого свинца

торяют трижды. Объединенные хлороформные экстракты концентрируют в чашке на водяной бане при 60—61° С или ротационном испарителе при 40° С до объема около 5 мл.

КОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В хроматографическую колонку на стеклянный фильтр насыпают 5 г безводного сульфата натрия, на образовавшийся слой наливают суспензию силикагеля*. После осаждения в колонку осторожно насыпают еще 5 г безводного сульфата натрия. Избыток хлороформа выпускают при помощи крана и сразу же медленно наносят образец. Стенки флакона обмывают двумя 5 мл порциями хлороформа, которые также переносят в колонку по достижении уровнем раствора образца поверхности верхнего слоя сульфата натрия в колонку порциями осторожно наливают 100 мл смеси хлороформ-метанол (97:3). Элюат собирают в 300 мл фарфоровую чашку или круглодонную колбу, концентрируют на водяной бане в чашке при 60—61° С или ротационном испарителе при 40° С до объема 1,5—2,0 мл. Концентрированный раствор переносят в центрифужную пробирку на 10 мл. Остатки смывают со стенок чашки или колбы 3 порциями хлороформа по 2 мл каждая. Объединенный экстракт в пробирке выпаривают досуха**. Остаток на дне и стенках пробирки тщательно растворяют в 0,2 мл хлороформа*** и тут же подвергают хроматографии в тонком слое сорбента.

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

1. Подготовка аналитической хроматографической пластины (АХП)

На пластине «Силуфол» (15 × 15 см или 20 × 20) при помощи острого тонкого предмета (иглы, скальпеля и др.) и линейки проводят четкие параллельные линии, делящие слой сорбента на хроматографические дорожки шириной 0,8 см с промежутками между ними 0,2 см. На одной из сторон пластины (край А), соответственно указанным дорожкам, простым карандашом наносят номера исследуемых образцов. На расстоянии 4 см от края противоположной стороны (край Б) и параллельно ему в промежутках между хроматографическими дорожками наносят карандашом пунктирную ли-

---

* — готовится из 10 г силикагеля (100—250 мкн) на 20 мл хлороформа

** — выпаривание лучше проводить в токе азота с использованием пастеровского капилляра, погруженного в экстракт

*** — пробирку плотно закрывают пробкой для предупреждения выпаривания растворителя

нию, обозначающую уровень нанесения образцов (линия старта). Приготовленные таким образом пластины должны быть сухими, для чего их следует хранить в условиях, предупреждающих увлажнение.

2. Нанесение образцов на АХП

Для достижения необходимой точности образцы объемом 20 мкл наносят на хроматографические дорожки с помощью микрошприца. При этом размеры образующихся пятен не должны превышать 3 мм в диаметре. Стандартные афлатоксины наносят на крайние хроматографические дорожки последними.

3. Проявление АХП включает 2 предварительных этапа: обезжиривание эфиром и разделение афлатоксинов

Для обезжиривания пластину, с нанесенными образцами, краем А опускают в камеру с эфиром, толщина слоя которого не превышает 1 см. Используемый эфир должен быть очищен от перекисей на колонке с окисью алюминия. Предварительно камера должна быть насыщена парами эфира, что достигается путем выстилания всей площади ее задней и боковых стенок фильтровальной бумагой и последующей герметизацией в течение 20—30 мин. тщательно притертой стеклянной крышкой. Пластины находятся в закрытой камере до момента, когда фронт растворителя достигнет уровня 0,5 см ниже края Б, после чего ее извлекают и высушивают на открытом воздухе. Процесс обезжиривания повторяют трижды. Затем край Б пластины с концентрированной на нем полосой примесей обрезают, отступая 1,5 см от линии старта (пунктирной линии), и удаляют.

Для разделения афлатоксинов пластинку стартовым краем опускают в ненасыщенную камеру со смесью растворителей хлороформ-ацетон (9:1). Погружение пластины следует проводить быстро, но осторожно без нарушения глади поверхности смеси, чтобы предотвратить смывание пятен афлатоксинов. Пластину оставляют в камере до момента достижения фронтом растворителя противоположного края, после чего ее извлекают и высушивают на воздухе.

Обнаружение и количественное определение афлатоксинов

Проявленную хроматограмму рассматривают в длинноволновом УФ-свете. Обнаружение на пластине пятен, соответствующих хроматографической подвижностью и цветом флуоресценции пятнам стандартов свидетельствует о возможном присутствии афлатоксинов в образцах пищевых продуктов.

Для исключения афлатоксиноподобных веществ рекомендуется использовать 3 дополнительных теста.

Йодный тест. Проявленная хроматограмма помещается на 30 сек. в эксикатор, насыщенный парами йода*. Затем пластину рассматривают под УФ-светом. Изменение цвета интенсивности флуоресценции говорит об отсутствии в образце афлатоксинов.

Тест с азотной кислотой. Проявленную хроматограмму опрыскивают водным раствором азотной кислоты (2:1) и рассматривают под УФ-светом. При этом свечение пятен стандартов меняется на желтый. Если таким же образом меняется свечение пятен образцов, то это указывает на содержание в них афлатоксинов.

Тест с трифторуксусной кислотой**. На соответствующие дорожки в точки нанесения конечных экстрактов исследуемых образцов и растворов стандартного афлатоксина, осторожно наносят по 1 капле концентрированного раствора трифторуксусной кислоты. Затем пластины помещают в темное место на 10—15 мин., после чего проводят этап проявления по описанному выше способу. При наличии в экстрактах афлатоксинов появляется дополнительное свечение с уменьшением Rf.

Количественное определение проводят путем сравнения интенсивности флуоресценции пятен афлатоксинов в экстрактах с интенсивностью флуоресценции различных количеств стандартов афлатоксинов, нанесенных на ту же пластину.

Расчет концентрации афлатоксина в продукте следует вести по формуле:

$$C = \frac{V_1 \cdot V_3 \cdot V_5 \cdot A}{V_2 \cdot V_4 \cdot V_6 \cdot M}, \text{ где:}$$

C — концентрация афлатоксина в мкг/кг или мкг/л;
V_1 — объем водно-метаноловой смеси в мл
— (для свежего мяса и субпродуктов — 232, для готовых мясных изделий — 200, для молока и жидких молочных продуктов — 250, для плотных молочных продуктов — 200);
V_2 — объем водно-метанолового фильтрата, предназначенного для дальнейшего анализа в мл (150);
V_3 — объем водно-метанолового фильтрата и раствора уксуснокислого свинца в мл (235);
V_4 — объем водно-метанолового фильтрата после обработки уксуснокислым свинцом и сульфатом аммония в мл (160);
V_5 — объем очищенного раствора экстракта в хлороформе перед тонкослойной хроматографией в мкл (100);
V_6 — объем раствора экстракта, наносимого на пластину мкл (2);
M — навеска или объем продукта, взятого на анализы г или мл;
A — количество афлатоксина в пятне образца АХП в мг.

---

* — для насыщения на дно эксикатора насыпают 2—3 г кристаллического йода

** — достаточно специфичен, основан на переводе афлатоксинов в полуацетальные формы

При строгом соблюдении объемно-весовых отношений, указанных в приведенной формуле, последнюю можно упростить путем введения коэффициента, учитывающего вес или объем исследуемого образца и динамику его аликвот в процессе анализа. В таком случае формула приобретает следующий вид:

$$C \text{ мкг/кг или мкг/л} = K \cdot A, \text{ где:}$$

К — коэффициент, имеющий значение:
для свежего мяса и субпродуктов — 0,272
для готовых мясных изделий — 0,195
для молока, жидких продуктов и биологических сред — 0,224
для плотных молочных продуктов — 0,195.

Приготовление эталонного раствора из кристаллического афлатоксина B_1

1 мг кристаллического афлатоксина B_1 помещают в мерную колбу на 100 мл и добавляют смесь бензол-ацетонитрил (98:2) до метки. 1 мл такого эталонного раствора, содержащего 10 мкл афлатоксина, переносят во флакон на 20 мл и полностью выпаривают растворители. Затем добавляют 20 мл вышеуказанной смеси, закрывают флакон притертой пробкой, в 1 мкл полученного раствора содержится 0,5 нг афлатоксина B_1.

Приготовление эталонного раствора из кристаллического афлатоксина M_1

Афлатоксин M_1 выпускается обычно в ампулах, содержащих 10 мкг кристаллического препарата. Ампулу вскрывают, содержимое растворяют в 2 мл смеси бензол-ацетонитрил (98:2) и переносят в мерную колбу на 20 мл. Ампулу промывают трижды 3-х мл порциями бензолацетонитрила и растворы объединяют в той же мерной колбе. Колбу заполняют указанной смесью растворителей до метки 20 мл и закрывают притертой пробкой. Таким образом, в 1 мкл эталонного раствора содержится 0,5 нг афла- токсина M_1.

Общие условия и правила работы

Афлатоксины — сильные токсичные и канцерогенные вещества. Поэтому для работы с ними необходимы определенные условия и строгое соблюдение ряда правил.

Исследования, связанные с афлатоксинами, следует проводить в отдельной комнате или в обычной химической лаборатории, имеющей боксовое отделение или настольный бокс. Афлатоксины следует хранить в местах, недоступных для посторонних (в закрывающихся на замок холодильниках или морозильных камерах, вне работы подлежащих опечатыванию).

Сосуды, содержащие афлатоксины подлежат обозначению «Яд» и в целях предупреждения загрязнения рабочего места должны находиться в стаканах или других емкостях. Рабочее место с той же целью нужно покрыть листом фильтровальной бумаги, которая после работы переносится в герметичный мешок или контейнер для последующего сжигания.

В случае попадания афлатоксина на лабораторное оборудование и предметы, их детоксикацию следует проводить тщательной обработкой 5 или 10% раствором хлорамина, а затем 1% раствором $NaHCO_3$.

Работать с афлатоксинами следует в халате, марлевой маске, клеенчатом фартуке и резиновых перчатках. Перчатки и фартук после работы необходимо обработать раствором хлорамина и тщательно промыть в проточной воде.

В случае попадания афлатоксинов на открытые участки тела, в глаза, на слизистую рта и носа, необходимо их немедленно и тщательно смыть 1% раствором борной кислоты, а затем проточной водой.

В лабораторных помещениях, где производится работа с афлатоксинами, запрещается курить, принимать пищу и воду.

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