

**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.

**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, vomitоксин, 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 впрядь 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

III. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ДИЭТИЛСТИЛЬБЭСТРОЛА В ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОВОДСТВА И В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ (химический метод)

Принцип метода

Метод основан на экстракции ДЭС и его конъюгатов полярным растворителем из мяса и субпродуктов, кислотном гидролизе конъюгатов в спиртовом растворе, очистке перераспределением в растворителях и адсорбционной хроматографией и количественном измерении с применением специфической фотохимической реакции и ГЖХ.

* — Методические рекомендации по определению химическим методом остаточных количеств диэтилстильбэстрола в продуктах животноводства и в биологических жидкостях, утв. МЗ СССР 09.12.83 г. № 2944-83

Реактивы

Хлороформ, ГОСТ 3160-51, х.ч., перегнанный
Эфир диэтиловый медицинский или ГОСТ 6255—52
Изооктан, х.ч.
Этанол, х.ч., перегнанный
Бензол, х.ч. для хроматографии
Метанол, х.ч.
Соляная кислота, конц., ГОСТ 3113-67, х.ч.
Гидрат окиси натрия, ГОСТ 4328-66, х.ч.
Натрий серноокислый, безводный, ГОСТ 4166-76, х.ч.
 β -глюкуронидаза, х.ч.
Силикагель Л, 40/100 для колоночной хроматографии
Пластины силуфола или пластины с нанесенным слоем силика-
геля для тонкослойной хроматографии
Бумага для хроматографии (Ленинградская быстрая, или
Фильтрак, или Ватман)
Целит, х.ч.
Ангидрид гептафтормасляный или трифторуксусный, х.ч.
Диэтилстильбэстрол, кристаллический, стандартный препарат,
х.ч.

Оборудование и лабораторная посуда

Скоростной смеситель типа РТ-1
Ротационный испаритель типа ЛГ-108
Аппарат для встряхивания проб типа АБУ-60
Хроматоскоп ФМТ или ртутная лампа типа ПРК-4
Центрифуга типа ЦЛС 31М
Газовый хроматограф *Цвет-106*
Насос водоструйный, ГОСТ 10696-75
Баня водяная типа ТУ 64-1-432-72 с электронагревателем
Денситометр типа ИРЕ-65.
Камера для тонкослойной хроматографии с притертой крышкой,
например, стеклянный четырехугольный сосуд 195 × 195 × 200 мм
завода «Дружная горка»
Термометр от 0° до 100°, ГОСТ 2045-71
Колбы мерные вместимостью 25, 50 и 100 мл, ГОСТ 1770-74
Склянки с притертыми пробками на 500 мл
Стаканы хим. на 250 и 500 мл
Ступка, ГОСТ 2045-71
Стеклянная колонка для экстракции, размером 480 см
Стеклянная колонка для хроматографии, размером 0,7 × 30 см
или пипетка на 10 мл с ровно отрезанным основанием
Воронки стеклянные диаметром 100 мм, ГОСТ 86В-75
Бюхнеровская воронка, ГОСТ 93-75
Пробирки хим. на 5 и 10 мл с НШ № 14,5 с притертыми
пробками, ГОСТ 10515—75

Колбы для упаривания на 50, 250 и 500 мл с НШ № 14,5 и НШ № 28, ГОСТ 10394-72.

Делительные воронки вместимостью 250 и 500 мл, ГОСТ 8613-75

Цилиндры мерные вместимостью 50, 100 и 250 мл, ГОСТ 1770-74

Колбы плоскодонные на 100 и 250 мл с НШ № 14,5, ТУ 48-52

Пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл, ГОСТ 20292-74

Микропипетки на 0,1 и 0,2 мл, ГОСТ 1770-74

Подготовка к определению

Перед проведением анализа необходимо подготовить колонку для адсорбционной хроматографии. Силикагель стандартизируют обезвоживанием и добавлением 5% воды. 5 г силикагеля помещают тонким слоем в стеклянный бюкс и прогревают при 200° в сушильном шкафу в течение 3 часов. Затем к силикагелю добавляют 5% воды (объем/вес силикагеля), тщательно перемешивают, помещают в аппарат для встряхивания и встряхивают в течение 30 мин. К силикагелю добавляют хлороформ (15—20 мл), перемешивают, суспензию переносят на колонку и формируют колонку размером 0,7 × 7,0 см. Так как силикагель очень быстро адсорбирует воду, то промежутки времени между стадиями его стандартизации и хроматографии должны быть минимальны. При использовании каждой новой партии силикагеля необходимо с применением стандарта ДЭС проводить контрольные исследования условий элюции препарата с колонки.

Определение ДЭС в мясе и субпродуктах

Экстракция образцов мяса и субпродуктов выполняется в 2 этапа: в скоростном смесителе и на колонке с применением целита. 20 г ткани мышц, печени или почек тщательно измельчают (готовят фарш), растирают в ступке и экстрагируют в скоростном смесителе — 60 мл 96% этанола. Тканевые остатки отделяют фильтрованием через бумажный фильтр на бюхнеровской воронке и рекстрагируют 96% этанолом (60 мл) в смесителе (1 стадия экстракции). После фильтрования тканевые элементы смешивают с 10 г целита и образовавшуюся «пушистую смесь» переносят на колонку, уплотняют и дополнительно экстрагируют на колонке 150 мл 96% этанола (2 стадия экстракции). Экстракты 1 и 2 стадии объединяют.

Гидролиз конъюгированных форм ДЭС проводится соляной кислотой в этаноле. К объединенному этанольному экстракту добавляют 10 мл 2 н HCl и выпаривают на роторном испарителе до объема 20—25 мл в течение 50—60 мин. при температуре 55° С. Выпавший осадок отделяют фильтрованием через бумажный фильтр.

Таблица 1

Распределение ДЭС между водной фазой и растворителем

Растворитель	Водная фаза	Коэффициент распределения
Хлороформ	вода	0,016
Хлороформ	1 н NaOH	16,6
Эфир	вода	0,01
Эфир	1 н NaOH	20,0

Примечание. Коэффициент распределения =

$$= \frac{\text{концентрация ДЭС в водной фазе}}{\text{концентрация ДЭС в растворителе}}$$

Таблица 2

Отделение ДЭС от различных веществ методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей: эфир-бензол (1:5)

Вещество	Rf
Диэтилстильбэстрол	0,5
Эстрон	0,57
Холестерин, холестерилкапронат, триолеин, трибутирин	> 0,60
Эстрадиол-17 β , эстрадиол-17 α , 16 α -оксистерон, 16-кето-17 β -эстрадиол, тестостерон, эпитестостерон	< 0,40
Эстриол, 17-эпистриол, 6 α -оксистерон, кортизол, кортизон, кортикостерон, альдостерон	< 0,20

Отфильтрованный гидролизат переносят в плоскодонную колбу, добавляют 40 мл дистиллированной воды, 60 мл хлороформа и встряхивают в аппарате для встряхивания в течение 30 мин. После разделения фаз в делительной воронке водную фазу экстрагируют 60 мл хлороформа. Хлороформные фазы объединяют, промывают 40 мл дистиллированной воды (встряхиванием в делительной воронке в течение 1—2 мин); водную фазу отбрасывают.

Перераспределение в системе растворителей — CHCl_3 -NaOH (табл. 1) проводят в 2-х делительных воронках, содержащих по 50 мл 1 н NaOH. Хлороформный экстракт вносят в каждую из делительных воронок, встряхивая со щелочью в течение 2 мин. Хлороформ отбрасывают, NaOH-фазы объединяют, подкисляют 2 н HCl до pH 4,0 и дважды экстрагируют равным объемом хлороформа. Хлороформные экстракты объединяют, фильтруют через безводный Na_2SO_4 (5—7 г) и выпаривают на роторном испарителе.

В случае образования эмульсии при экстракции хлороформом разделение фаз достигается центрифугированием при 5000 об. в течение 20 мин.

Хроматография на колонке силикагеля Л проводится методом ступенчатой элюции. Исследуемую пробу в 1—2 мл хлороформа наносят на колонку. Затем на колонку последовательно наносят следующие элюирующие растворы: 20 мл хлороформа (фракция № 1, не содержащая ДЭС), 10 мл 1% этанола в хлороформе (фракция № 2, не содержащая ДЭС), 30 мл 1,5% этанола в хлороформе (фракция № 3, содержащая ДЭС). Фракцию № 3 выпаривают до минимального объема.

Тонкослойная хроматография с последующей денситометрией рассчитана на окончательную очистку экстрактов (табл. 2) и количественное измерение с использованием специфической фотохимической реакции. После хроматографии на колонке сконцентрированную фракцию № 3, содержащую ДЭС, наносят на пластину силуфола и хроматографируют в системе растворителей: эфир-бензол (1:5). В дальнейшем проводят фотохимическую реакцию непосредственно на хроматограмме — пластину облучают в УФ-свете в течение 30 мин на ртутной лампе (или Хроматоскопе). Под влиянием УФ-света происходит превращение ДЭС в желто-окрашенный трициклический дикетон фенантроновой серии и на белом фоне пластины появляются желтые пятна продукта фотохимической реакции. Вырезают полосу хроматограммы размером 4 × 15 см (с проявленными пятнами) и денситометрируют в отраженном свете на денситометре ИРЕ-65. Количество ДЭС определяют по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой готовят следующие разведения ДЭС в 96% этаноле: 4 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 40 мкг/мл, 80 мкг/мл, 160 мкг/мл. По 0,05 мл каждой пробы наносят на пластину силуфола, хроматографируют и проявляют пластину, как описано выше. Денситометрический метод позволяет выявить 0,0002 мг ДЭС в образце мясопродукта, весом 20 г; при пересчете на 1 кг — 0,004 мг/кг.

Хроматография на бумаге проводится при использовании ГЖХ — способа количественного измерения. Частично очищенные экстракты после хроматографии на колонке силикагеля (фракция № 3, содержащая ДЭС), а также стандарт ДЭС (5—10 мкг) наносят на полосу хроматографической бумаги и хроматографируют (нисходящий метод) в системе растворителей: бензол-метанол-вода (5:7:3). Полоску бумаги, соответствующую стандарту ДЭС, вырезают и облучают в УФ-свете (оставшуюся полосу бумаги с опытными пробами не облучают). В результате облучения на бумаге появляются желтые пятна продукта фотохимической реакции. По локализации стандарта устанавливают участки хроматограммы, соответствующие расположению ДЭС исследуемых проб. Эти участки бумаги вырезают, измельчают ножницами и помещают в пробирку с 10 мл этанола. Элюцию проводят в течение 10 часов; элюат выпаривают.

ГЖХ-способ количественного измерения рассчитан на анализ фторпроизводных ДЭС. Для их получения сухой остаток (после

выпаривания элюата) растворяют в 0,5 мл бензола, добавляют 10 мкл ангидрида (гептафтормасляного или трифторуксусного) и инкубируют 30 мин при 60°. Смесь высушивают под током азота, сухой остаток растворяют в 0,5 мл бензола и проводят ГЖХ; остатки ангидрида после инкубации могут быть удалены промыванием водой: к 0,5 мл смеси добавляют 0,3 мл дистиллированной воды, встряхивают 0,5—1 мин и центрифугируют (бензольную фазу используют для ГЖХ). Условия ГЖХ-анализа (детектор электронного захвата): стеклянная колонка размером 3 метра с 5% SE-60 на Хроматоне N-AW ГМДС; температура испарителя 230°, колонки — 190°, детектора — 240°; газ-носитель — азот, 40 мл/мин. В этих условиях время удерживания дигептафторбутирата ДЭС составляет 7 мин. ГЖХ-метод позволяет выявить 1—10 нг ДЭС в пробе.

Особенности метода при определении ДЭС в биологических жидкостях и в жировой ткани

Особенности определения ДЭС в биологических жидкостях касаются стадии гидролиза, экстракции и очистки перераспределением в растворителях (остальные стадии, как в основной прописи метода). К пробе биологической жидкости (3—5 мл желчи, мочи или молока) добавляют 0,1 М ацетатный буфер, pH 4,8 (3 объема буфера) и β -глюкуронидазу (1000 ед/мл). Гидролиз проводят 24 часа при 37°. Гидролизат экстрагируют эфиром (3 × 20 мл). Эфирные экстракты встряхивают в делительной воронке с 1 н NaOH (2 × 40 мл). NaOH-фазы объединяют, подкисляют 2 н HCl до pH 4,0, экстрагируют равным объемом хлороформа (дважды). Объединенные хлороформные фазы обезвоживают фильтрованием через безводный Na₂SO₄ и выпаривают на ротаторном испарителе.

При определении ДЭС в сыворотке крови гидролиз не проводят. 0,3—3,0 мл сыворотки разводят в 10 раз дистиллированной водой и экстрагируют эфиром (3 × 0,5 объема). Эфирный экстракт встряхивают в делительной воронке с 1 н NaOH (2 × 0,3 объема). NaOH-фазы объединяют и, как описано выше, подкисляют, экстрагируют хлороформом, который обезвоживают и выпаривают.

Метод определения ДЭС в жировой ткани включает на первых этапах стадию экстракции изооктаном и очистки в системе: изооктан-1 н NaOH. Гидролиз не проводят, т.к. метод рассчитан на определение неконъюгированного ДЭС.

10 г жировой ткани мелко измельчают и расплавляют прогреванием в изооктане. Полученные экстракты фильтруют на бюchnerовской воронке через бумажный фильтр. Фильтрат переносят в делительную воронку, добавляют 40 мл 1 н NaOH и встряхивают в течение 2—3 мин. NaOH-фазу подкисляют, экстрагируют хлороформом и в дальнейшем адсорбционную хроматографию и количественное измерение проводят, как изложено в основной прописи метода.

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 зеараленона 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-этилртути 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 (флуориметрический 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 Диэтилstilбэстрола 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 И. 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 x 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. Пагатинская, 1.