

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

Инструкция 4.1.10-15-12-2006
МЕТОДИКА ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕЛЕНА
В ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ, ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ,
КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ И ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
ОБЪЕКТАХ

Минск 2006

УТВЕРЖДЕНО
Постановление
Главного государственного
санитарного врача
Республики Беларусь
18.07.2006 № 89

Инструкция 4.1.10-15-12-2006
МЕТОДИКА ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕЛЕНА
В ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ, ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ,
КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ И ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
ОБЪЕКТАХ

1. Область применения

Настоящая Инструкция устанавливает методику определения содержания селена в продовольственном сырье; пищевых продуктах; биологически активных добавках к пище (далее - БАД); косметической продукции; биологических объектах: биологических материалах человека и животных (цельной крови, плазме и сыворотке крови, волосах головы и др.), лекарственно-техническом сырье (цветах, листьях, травах, клубнях, плодах, ягодах, лекарственных грибах и др.).

Настоящая Инструкция предназначена для лабораторий органов и учреждений государственного санитарного надзора, аккредитованных в установленном порядке, других организаций здравоохранения и научно-исследовательских организаций.

2. Сущность метода

Сущность метода определения селена заключается в осуществлении мокрого сжигания образца смесью азотной и хлорной кислот или смесью азотной кислоты и пероксида водорода (в случае автоклавной минерализации), восстановлении шестивалентного селена до селена четырехвалентного действием соляной кислоты и образовании комплекса селенистой кислоты с 2,3-диаминонафталином – пиазоселенола, величина флуоресценции которого пропорциональна содержанию селена в пробе.

Нижний предел определения селена 0,08 мкг/кг (мкг/ дм³).

3. Отбор и подготовка проб

Отбор образцов проводится в соответствии с требованиями ГОСТов на исследуемые продукты: ГОСТ 5667 – 65 “Хлеб и хлебобулочные изделия”, ГОСТ 27668 – 88 “Мука и отруби”, ГОСТ 26312.1 – 84 “Крупа”, ГОСТ 8756.0 – 70 “Продукты пищевые консервированные”, ГОСТ 7269 –

79 “Мясо”, ГОСТ 7202.0 – 74 “Мясо птицы”, ГОСТ 9792 – 73 “Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц”, ГОСТ 3622 – 68 “Молоко и молочные продукты”, ГОСТ 7631 – 85 “Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки”, СТБ 1036 – 97 “Продукты пищевые и продовольственное сырье”, СТБ 254 – 2004 «Яйца куриные пищевые».

Отбор проб БАД проводят в соответствии с ГОСТ 8321 – 73 «Статистический контроль качества. Методы случайного отбора выборок штучной продукции».

Отбор проб косметической продукции проводится согласно Инструкции «Порядок проведения отбора образцов парфюмерно-косметической продукции для испытаний в целях государственной гигиенической регистрации и сертификации» № 11 – 23 – 4 – 00, утвержденной Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь; Председателем Государственного Комитета по стандартизации, метрологии и сертификации Республики Беларусь 20 сентября 2000 года, ГОСТ 29188.0 – 91 «Изделия парфюмерно-косметические. Правила приемки, отбора проб, методы органолептических испытаний».

Отбор проб биологического материала проводится в соответствии с протоколом забора биологического материала согласно «Инструкции по оценке и коррекции селенового статуса организма человека в различных экологических условиях проживания», № 12 – 0105, утвержденной Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 06 июня 2005 года.

Отбор проб лекарственно-технического сырья проводят в соответствии с ГОСТ 24027.0 – 80 «Сырье лекарственное растительное. Правила приемки и отбора проб», Государственной фармакопией, 11-м изданием.

Отобранные образцы упаковывают в полиэтиленовые мешки или стеклянные банки с притертыми крышками. Образцы доставляют в лабораторию для исследований сразу после отбора проб или, в случае необходимости, хранят в сухом месте, а для скоропортящихся образцов осуществляют замораживание при температуре от -4°C до -10°C , используя для этой цели морозильные камеры или другое охлаждающее оборудование.

К исследованию скоропортящихся образцов следует приступать в день их доставки в лабораторию. При отсутствии такой возможности образцы должны храниться при температуре от -4°C до -10°C не более 2 месяцев со времени отбора образца.

Образцы проб (зерновых, мяса, рыбы, грибов, лекарственно-технического сырья) перед проведением анализа высушивают при

температуре не выше 60 °С на воздухе или в эксикаторе над пятиокисью фосфора. Консервы (мясные, рыбные, овощные, мясо-растительные, из мяса птицы), колбасные изделия и молочные продукты, БАДы, косметическую продукцию допускается исследовать без предварительной сушки.

Высушенные образцы растирают в фарфоровой ступке, перемешивают и отбирают пробу на исследование. Консервированные пищевые продукты перед проведением исследования гомогенизируют.

4. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы

Алюминиевый блок сжигания на 40-60 проб с глубиной отверстий 6,5 см и диаметром на 0,01 см, превышающем диаметр используемых пробирок для сжигания. Блок сжигания должен быть снабжен устройством регулировки температуры: реле, контактным термометром; или

Блок нагревания типа SBH 130, SBH 130D, SBH 200D, SBH 200D/3, SBH 130 DC; или

Автоклавный комплекс МКП – 04, состоящий из: автоклавов аналитических научно-производственно-внедренческой фирмы (далее - НПВФ);

термостата ТМ бм, обеспечивающего поддержание заданного температурного режима в интервале (160-240⁰ С) с погрешностью ±5⁰С;

прибора регулирования температуры автоматического ПР.ТРА –1,0;

устройства для охлаждения автоклавов

Электроплитка бытового назначения

Контактный термометр, работающий в диапазоне температур 0 – 200⁰С

Электрореле

Весы аналитические ВЛП – 20 или другие лабораторные весы 2-го класса точности с пределом взвешивания до 20 г

Баня водяная с терморегулятором

Микроизмельчитель ткани РТ–2

или другой аналогичный гомогенизатор

Спектрофлуориметр работающий в области длин волн: λ возбуждения 300-500 нм, λ эмиссии 300-700 нм

ТУ 48 – 0572 – 31
259

ГОСТ 14919 – 83

ГОСТ 9871 – 75

ТУ 25111378 – 77

ГОСТ 19491 – 74

ТУ 64–1–505 – 79

| | |
|--|-----------------------------------|
| Пробирки с притертыми пробками высотой 12 см | ГОСТ 1770-74Е |
| Пробирки П-2-10-14/23 ХС | |
| Колбы конические на шлифах с притертыми пробками вместимостью 50,100, 200 см ³ | ГОСТ 10394 –72 |
| Цилиндры мерные вместимостью 50 и 100 см ³ | ГОСТ 1770 – 74 |
| Колбы мерные вместимостью 500, 1000 см ³ | ГОСТ 1770 – 74 (ИСО 1042 – 83) |
| Пипетки (бюретки) вместимостью 0,5;1,0; 5,0 и 10 см ³ | ГОСТ 20292 – 72 |
| Воронки химические | ГОСТ 8613 – 75 |
| Воронка делительная вместимостью 100 см ³ | ГОСТ 2536 – 82 |
| Фильтры обеззоленные | ТУ 6 – 09 – 1678 – 77 |
| Бумага индикаторная, универсальная, рН = 1 – 12 | ТУ 6 – 09 – 1181 – 76 |
| Аммиак водный, плотность 0,88г/см ³ | ГОСТ 3760 - 76 |
| Вода дистиллированная | ГОСТ 66709 – 72 |
| Гексан, С ₆ Н ₁₄ | ТУ 6 – 29 – 3375 – 78 |
| Циклогексан, С ₆ Н ₁₂ | ТУ – 2631– 029 – 44493179 – 99 |
| 2,3-диаминонафталин, С ₁₀ Н ₁₀ Н ₂ , чистота не менее 98% | |
| Кислота азотная особой чистоты, ННО ₃ , (ос. ч.), d=1,413 | ГОСТ 11125 – 84 |
| Кислота соляная, НСІ, плотность 1,19 г/см ³ | ГОСТ 3118 – 77 |
| Кислота хлорная, НСЛО ₄ , 42% или 57% (в случае использования алюминиевого блока сжигания) | ТУ 6–09–2878 – 73 |
| Пероксид водорода, Н ₂ О ₂ , 30% | ГОСТ 10929 – 76 |
| Натрий селенистокислый, Na ₂ SeO ₃ , чистый (ч.) | ТУ 6 – 09 – 1316 – 76 |
| Образец сравнения с известным содержанием селена | |
| Тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, С ₁₀ Н ₁₂ Н ₂ Na ₄ О ₈ | ТУ 6 – 09 – 11 – 1298 – 79 |

Могут быть использованы средства измерений, вспомогательные устройства и реактивы по точности и квалификации, не уступающие указанным в настоящей Инструкции.

5. Требования безопасности

Помещение, в котором проводится определение содержания селена, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией. Все операции исследований необходимо проводить в вытяжном шкафу с использованием индивидуальных средств защиты при включенной вентиляции в условиях, исключающих попадание химических веществ на обслуживающий персонал или в атмосферу помещения в концентрациях, превышающих гигиенические нормативы, установленные в Санитарных правилах и нормах “Перечень регламентированных в воздухе рабочей зоны вредных веществ” № 11 – 19 – 94, утвержденных Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 09 марта 1994 года, и продленных в действии постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 31 декабря 1998 г. №53, с изменениями и дополнениями к ним.

Работу с 2,3-диаминонафталином следует осуществлять только в резиновых перчатках.

При работе с растворами соблюдают требования безопасности, установленные для работ с токсичными, едкими и легковоспламеняющимися веществами по ГОСТ 12.1.005 – 88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны», ГОСТ 12.1.007 – 76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности». При работе с использованием автоклавного комплекса МКП-04 соблюдают правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ 12.1.019 – 79 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты», а также инструкцией по эксплуатации прибора.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 – 91 «Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования». Иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009 – 83 «Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание».

6. Требования к квалификации оператора

К выполнению исследований допускают лиц, имеющих квалификацию не ниже инженера-химика, удостоверение по обслуживанию сосудов, работающих под давлением (при использовании автоклавного комплекса МКП-04), изучивших правила безопасной работы в химических лабораториях и настоящую Инструкцию.

7. Условия выполнения измерений

Приготовление растворов, подготовку проб к исследованию и проведение исследований осуществляют при следующих условиях:

температура окружающего воздуха $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$;
относительная влажность воздуха не более 80 % при $T = 25 ^\circ\text{C}$;
атмосферное давление 84,0 – 106,7 кПа (630 – 800 мм рт.ст.).

8. Приготовление растворов

8.1. Растворы соляной кислоты:

0,1 М раствор: 1 см³ 36% соляной кислоты разбавляют в мерной колбе до 100 см³ дистиллированной водой;

6 М раствор: 51 см³ 36 % соляной кислоты разбавляют в мерной колбе до 100 см³ дистиллированной водой.

8.2. Раствор аммиака: 25 % раствор аммиака разбавляют дистиллированной водой 1:1.

8.3. Раствор тетранатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты: 1,25 г соли растворяют в 100 см³ дистиллированной воды.

8.4. Раствор 2,3-диаминонафталина: 0,1г реактива растворяют в 100 см³ 0,1 М соляной кислоты при слабом нагревании (10-15 минут при температуре не выше 50 °С). Полученный раствор переносят в делительную воронку, трижды экстрагируют (3x15см³) гексаном (циклогексаном), водный слой отделяют, фильтруют через фильтровальную бумагу, хранят под слоем гексана (циклогексана) при температуре от 0°С до +4 °С в темноте до момента флуориметрического определения. Приготовленный раствор 2,3-диаминонафталина можно хранить до двух недель под слоем гексана (циклогексана) в склянке из темного стекла при температуре 0 °С до +4 °С.

8.5. Стандартные растворы селенистокислого натрия -
основной стандартный раствор содержащий 1 мкмоль селена в 1 см³:
растворяют 0,01729 г селенистокислого натрия в небольшом количестве 0,1М соляной кислоты в мерной колбе на 100 см³ и доводят до метки соляной кислотой указанной концентрации. Раствор хранят в темноте не более 1 месяца;

рабочий стандартный раствор содержащий 1 нмоль селена в 1 см³:
пипеткой вносят 0,5 см³ основного стандартного раствора в мерную колбу вместимостью 500 см³ и доводят объем до метки 0,1М раствором соляной кислоты. Раствор хранят в темноте не более суток.

9. Мокрое сжигание

9.1. Мокрое сжигание в алюминиевом блоке проводят следующим образом: взвешивают и переносят в пробирки для сжигания от 50 до 100

мг (в зависимости от содержания селена), но не более 100 мг исследуемого образца и соответствующий образец сравнения. Для построения калибровочной кривой в 6 пробирок вносят: 0 (контрольный раствор); 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 0,6 см³ стандартного рабочего раствора селенистоокислого натрия (согласно п.8.5 настоящей Инструкции), что соответствует 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 0,6 нмоль селена в пробе. Во все пробирки добавляют по 1 см³ азотной кислоты и 0,7 см³ 52 %-ной хлорной кислоты (1 см³ 42%-ной кислоты) и оставляют при комнатной температуре на 12-18 часов. Затем пробирки помещают в блок сжигания и осуществляют минерализацию в температурном режиме: 120 °С – 1 час, 150 °С – 1 час, 180 °С – 185 °С – 1,5 часа. По окончании процесса растворы образцов должны быть бесцветными. При наличии обугливания сжигание следует повторить на новой навеске, увеличив количество хлорной кислоты до 1,0 см³ 52% или 1,4 см³ 42%.

9.2. Мокрое сжигание в аналитическом автоклаве НПВФ проводится согласно Инструкции 4.1.10-14-5-2006 «Методика автоклавной пробоподготовки пищевых продуктов, биологических материалов, косметической продукции, почвы, отходов производства и потребления для определения содержания в них токсичных и минеральных элементов», утвержденной постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 17 февраля 2006 г. № 18.

10. Удаление следов азотной кислоты

Для удаления следов азотной кислоты блок сжигания охлаждают до 150 °С, добавляют к пробам 1-2 капли перекиси водорода и выдерживают при указанной температуре в течение 10 минут. По окончании процесса пробы сразу же вынимают из блока сжигания.

В случае использования для мокрого сжигания аналитических автоклавов НПВФ, полученные после минерализации образцы переносят в тигли, добавляют 2-4 капли перекиси водорода и выпаривают досуха на водяной бане. Полученный остаток растворяют в 0,1 М соляной кислоте, количественно переносят в мерную пробирку или мерную колбу требуемого объема и разбавляют раствором соляной кислоты такой же концентрации.

11. Восстановление шестивалентного селена до селена четырехвалентного

К пробам (содержащим до 0,6 нмоль селена) добавляют по 1 см³ 6 М соляной кислоты и выдерживают при 110 °С в блоке сжигания (или нагревания) в течение 10 минут. По окончании процесса пробы сразу же вынимают из блока сжигания (нагревания) и добавляют по 1 см³ дистиллированной воды.

12. Конденсация селенистой кислоты с 2,3-диаминонафталином

В каждую пробирку добавляют по 0,5 см³ раствора тетранатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты и по 1 см³ разбавленного аммиака согласно п. 8.2 настоящей Инструкции. Быстро доводят рН проб до 1-1,5 по универсальному индикатору, добавляя в случае необходимости по каплям разбавленный аммиак или раствор 0,1 М соляной кислоты. К полученным растворам добавляют по 1,0 см³ заранее приготовленного раствора 2,3-диаминонафталина согласно п. 8.4 настоящей Инструкции и выдерживают 30 минут при 50 °С, закрыв предварительно пробы от попадания прямого света.

По окончании процесса пробы вынимают, охлаждают до комнатной температуры и каждую интенсивно экстрагируют в 2,5 см³ гексана (циклогексана) в течение 50 - 60 секунд, используя ручное встряхивание.

Определяют величину флуоресценции органического экстракта при λ возбуждения 376 нм и λ эмиссии 518 нм.

Дополнительный контроль за точностью результатов анализа осуществляют, снимая спектры флуоресценции при указанной длине волны возбуждающего света в интервале длин волн 450 - 600 нм. Полученные спектры должны иметь один максимум флуоресценции при 519 нм. Точность анализа определяют также сравнением результата определения селена в образце сравнения с регламентируемым значением.

13. Обработка результатов

13.1. Массовую долю селена (X) в мкг/кг (мкг/дм³) образца вычисляют по формуле:

$$X = 79 \cdot C / a, \text{ где}$$

C - количество нмоль селена в пробе, определенное по стандартной кривой, нМ;

79 - атомный вес селена;

a - масса навески образца, взятого на анализ, г, или, для жидких образцов, объем пробы, взятой на анализ, см³.

13.2. За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение двух определений.

Относительное стандартное отклонение в интервале от 1 до 600 мкг/кг (мкг/дм³) – 20%.

СОДЕРЖАНИЕ

Инструкция 4.1.10-15-12-2006 «Методика флуориметрического определения селена в продовольственном сырье, пищевых продуктах, косметической продукции и других биологических объектах»

| | Стр. |
|--|------|
| 1. Область применения..... | 2 |
| 2. Сущность метода..... | 2 |
| 3. Отбор и подготовка проб..... | 2 |
| 4. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы..... | 4 |
| 5. Требования безопасности | 6 |
| 6. Требования к квалификации оператора..... | 6 |
| 7. Условия выполнения измерений | 7 |
| 8. Приготовление растворов..... | 7 |
| 9. Мокрое сжигание | 7 |
| 10. Удаление следов азотной кислоты..... | 8 |
| 11. Восстановление шестивалентного селена до селена четырёхвалентного | 8 |
| 12. Конденсация селенистой кислоты с 2,3-диаминонафталином | 9 |
| 13. Обработка результатов | 9 |

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Настоящая Инструкция подготовлена Государственным учреждением «Республиканский научно-практический центр гигиены» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (к.м.н. Зайцев В.А., к.х.н. Бутько З.Т., к.т.н. Ивашкевич Л.С.) на основе Методических указаний МУК 4.1.033 – 95 «Определение селена в продуктах питания», утвержденных Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 24 июля 1995 года

2. Утверждена постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 18.07.2006 № 89

3. Введена впервые.