

119992, Россия, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр.11

Тел./Факс (495) 939-59-67, тел. 939-58-06; [www.bcmst.ru](http://www.bcmst.ru), E-mail: [info@bcmst.ru](mailto:info@bcmst.ru)

# ИНСТРУКЦИЯ

по применению Аналитического комплекта

*Микотоксин-4*

МОСКВА

2008

Настоящая Инструкция предназначена для описания условий и способов применения Аналитического комплекта в подготовке проб и хроматографическом определении микотоксинов в продовольственном сырье и пищевых продуктах. В Инструкции также изложены рекомендации по работе с анализируемыми пробами, соблюдение которых повышает степень извлечения определяемых микотоксинов.

Авторы предлагаемых в настоящей Инструкции методических подходов к определению микотоксинов методом твёрдофазной экстракции с радостью и огромным вниманием отнесутся к любым замечаниям и предложениям, относящимся к работе с Аналитическими комплектами.

## **I. Цель и назначение Аналитического комплекта *Микотоксин-4***

### ***I.1. Цель выпуска Аналитического комплекта***

Целью выпуска Аналитического комплекта *Микотоксин-4* является обеспечение воспроизводимой количественной пробоподготовки и хроматографического анализа образцов зерна и зернопродуктов, орехов и семян масличных культур, а также растительного масла, испытание которых на возможное содержание афлатоксина В<sub>1</sub>, дезоксиниваленола, зеараленона и Т-2 токсина предусмотрено основным документом “Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов”, СанПиН 2.3.2.1078-01, М., Изд. Минздрав России, 2002.

Номинальные диапазоны определяемых содержаний указанных микотоксинов в зерне и зернопродуктах, в семенах масличных культур и растительном масле составляют:

- Афлатоксин В<sub>1</sub> - 0.003-0.03 мг/кг, зеараленон – 0.01-0.3мг/кг (0.1-3 мг/кг для кукурузы);
- Дезоксиниваленол-0.1-3 мг/мл, Т-2 токсин-0.01-0.3 мг/кг.

### ***I.2. Назначение Аналитического комплекта***

Аналитический комплект *Микотоксин-4* предназначен для концентрирования и очистки водно-ацетонитрильных экстрактов образцов от компонентов, мешающих определению афлатоксина В<sub>1</sub>, зеараленона, дезоксиниваленола и Т-2 токсина методами высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ), тонкослойной (ТСХ) и газожидкостной (ГЖХ) хроматографии.

Методы подготовки проб и количественного анализа указанных микотоксинов описаны в следующих нормативных документах:

- “Определение массовой концентрации микотоксинов в продовольственном сырье и продуктах питания. Подготовка проб методом твердофазной экстракции”, МУК 4.1.787-99, Минздрав России, М., 1999.
- “Продукты пищевые. Методы выявления и определения содержания афлатоксинов В<sub>1</sub> и М<sub>1</sub>”. ГОСТ Р 30711-2001.
- “Выполнение измерений массовой доли микотоксинов в пищевых продуктах и продовольственном сырье методом тонкослойной хроматографии”. М-МВИ-68-00.
- “Выполнение измерений массовой доли микотоксинов в пищевых продуктах и продовольственном сырье методом высокоэффективной хроматографии”. БСТ-МВИ-02-01.
- “Методические рекомендации по обнаружению, идентификации и определению содержания Т-2 токсина в пищевых продуктах и продовольственном сырье”, утв. МЗ СССР № 3184-84.

### ***1.3. Особенности Аналитического комплекта***

Характерные особенности Аналитического комплекта:

- Замена при подготовке проб традиционной жидкостной экстракции, требующей больших объемов токсичных и дорогостоящих органических растворителей, на твердофазную экстракцию (ТФЭ) с применением концентрирующих патронов “ДИАПАК” (ЗАО “БиоХимМак СТ”);
- Близкие к количественным выходы афлатоксина В<sub>1</sub> (~75%), зеараленона (~70%), дезоксиниваленола и Т-2 токсина (~85%);
- Высокая степень очистки проб от примесей;
- Использование однотипных патронов для твердофазной экстракции и очистки всех нормируемых микотоксинов, что значительно экономит средства потребителей;

- Широкое использование техники вакуумирования при твердофазной экстракции, включая применение т.н. вакуумного манифолда для одновременной подготовки нескольких проб;
- Различные режимы ВЭЖХ-разделения и детектирования микотоксинов, позволяющие использовать в том числе доступные и дешевые комбинации оборудования.

Уникальной особенностью комплекта *Микотоксин-4* является возможность совместного определения афлатоксина В<sub>1</sub>, зеараленона, дезоксиниваленола и Т-2 токсина **в одном и том же (!)** экстракте зерна, зернопродуктов, орехов, семян масличных культур, растительного масла, кофе- и какао-продуктов в экспресс-варианте, что обеспечивает исключительные преимущества для *сертификационных работ* центров ГСЭН России, станций защиты растений, ветеринарных и агрохимических служб.

Наличие *экспресс-варианта* позволяет в несколько раз сократить время пробоподготовки и повысить производительность методики в условиях массового анализа. Вместе с тем, сохранение основного принципа экстракции микотоксинов в водном ацетонитриле дало возможность использовать те же патроны в нормативных режимах применения по МУК 4.1.787-99, что обеспечило преемственность метрологических характеристик измерения массовой доли по М-МВИ-68-00 и БСТ-МВИ-02-01 по отношению к типовой схеме.

Эти особенности позволяют реализовать единую схему пробоподготовки как для полуколичественной оценки содержания микотоксинов методом ТСХ, так и для точного количественного их определения методом ТСХ с видеоденситометрией и ВЭЖХ на традиционных жидкостных хроматографах зарубежных фирм и на отечественных хроматографах “Милихром”. Такой комплексный подход к анализу микотоксинов разработан в России впервые.

## II. Состав комплекта<sup>1</sup> *Микотоксин-4*

1. Комплект, обеспечивающий подготовку 100 единичных проб методом твердофазной экстракции для определения микотоксинов, включает сорбенты ДИАСОРБ А и АУ и патроны ДИАПАК двух разновидностей, выпускаемые по ТУ 4215-002-05451931-94:

- ДИАСОРБ А (3x100 мл) – специальный сорбент для приготовления 100 шт. концентрирующих патронов ДИАПАК А-3 для предварительной очистки водно-ацетонитрильного экстракта В<sub>1</sub> и зеараленона, одноразового применения;
- ДИАСОРБ АУ (3x100 мл) – специальный сорбент для приготовления 100 шт. концентрирующих патронов ДИАПАК АУ-3 для предварительной очистки водно-ацетонитрильного экстракта дезоксиниваленола и Т-2 токсина, одноразового применения;
- ДИАПАК П-3 (2 шт.) - универсальный концентрирующий патрон многоразового применения (до 50 проб) с набором верхних и нижних фильтров;
- ДИАПАК Н (20 шт.) - универсальный патрон для тонкой очистки многоразового применения (до 10 проб).

2. Стандартные растворы микотоксинов объёмом 1 мл в ампуле (3 шт. или 4 шт. – *Микотоксин-4 ТСХ*) с аттестованными концентрациями (точное значение концентрации указывается в прилагаемом паспорте), свидетельство о метрологической аттестации и общая инструкция по применению стандартного образца прилагаются:

---

<sup>1</sup>Примечание.

1. При анализе кукурузы и продуктов из нее вместо патрона ДИАПАК Н используется отдельно поставляемый одноразовый патрон ДИАПАК С.
2. Общелабораторное оборудование и растворители в состав набора не входят, их варианты приведены в МУК 4.1.787-99.

- 10-100 мкг/мл в ацетонитриле (ВЭЖХ);
  - 5-15 мкг/мл в смеси бензол-ацетонитрил (ТСХ).
3. Средство разделения (по ТУ 4215-001-05451931-94):
- колонка Eurospher-100-C18 или ДИАСФЕР-110-C16, 4×150 мм, для любого импортного хроматографа, 1 шт. (колонка **ТИП 1**);
  - колонка Eurospher-100-C18 или ДИАСФЕР-110-C16, 2×150 мм, для любого импортного хроматографа с детектором, снабженным специальной микрокюветой, 1 шт. (колонка **ТИП 2**);
  - колонка ДИАСФЕР-110-C16, 2×80 мм и 2×75 мм, для хроматографов “Миличром-5-3 (-5-7)” и “Миличром А-02”, соответственно, 1 шт. (колонка **ТИП 3**);
  - тонкослойные хроматографические пластины ПТСХ-АФ-В 10×15 см, 100 шт. (Аналитический комплект *Микотоксин-4 ТСХ*);
4. Корпус пластиковый колонки без фильтра (воронка) – 10 шт;
5. Инструкция по применению Аналитического комплекта *Микотоксин-4*.

### **III. Порядок проведения пробоподготовки**

#### **III.1. Отбор пробы и экстракция микотоксинов**

##### **1. Зерно и зернопродукты**

Традиционная экстракция. 25 г размолотой пробы перенести в коническую колбу, залить 125 мл *экстрагента* (смеси вода-ацетонитрил (16:84) и интенсивно перемешивать в течение 30 мин. Готовый *водно-ацетонитрильный экстракт* отфильтровать через бумажный фильтр “синяя лента”.

Экспресс-вариант. В центрифужной пробирке на 25 мл суспендировать 5.0 г пробы в 12 мл *экстрагента*, затем добавить дополнительную воду, объем которой рассчитать по формуле:  $V = 6 - X$ , где  $X$  – масса воды в навеске образца, например, 1 г при 20% влажности. Закрыть пробирку пробкой и встряхивать смесь вручную в течение 1 мин. Внести 6 г безводного  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и повторить встряхивание. Центрифугировать 5 мин при  $3000 \text{ мин}^{-1}$ , перенести верхний слой (*ацетонитрильный экстракт*) в небольшую колбу, отфильтровав через маленькую воронку с плотным ватным тампоном.

## **2. Орехи, семена масличных культур**

Традиционная экстракция. 25 г размолотой пробы перенести в коническую колбу, залить 125 мл смеси вода-ацетонитрил (16:84) и 40 мл гексана и интенсивно перемешивать в течение 30 мин. Внести в смесь 1 г хлорида натрия и после перемешивания в течение 5 минут отфильтровать через бумажный фильтр “синяя лента”. Перенести смесь в делительную воронку вместимостью 250 мл и после расслоения отобрать нижний водно-ацетонитрильный слой. Обезжирить экстракт интенсивным встряхиванием с 25 мл гексана (гептана, петролейного эфира) в делительной воронке, собрать нижний слой и снова обезжирить его 25 мл гексана. Собрать готовый *водно-ацетонитрильный экстракт*.

Экспресс-вариант. Экстракция проводится в присутствии углеводородного *растворителя* (гексан, гептан, петролейный эфир (70/100)). В центрифужной пробирке 5.0 г охлажденной до  $-18^\circ\text{C}$  и тонко размолотой пробы смешать с 8 мл *растворителя*, затем добавить 12 мл *экстрагента* и встряхивать вручную 1 мин, затем внести 2 г безводного  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и повторить встряхивание. Центрифугировать 5 мин при  $3000 \text{ мин}^{-1}$  и отобрать 8 мл среднего слоя (*ацетонитрильного экстракта*) с помощью шприца с длинной и широкой иглой.



### 3. *Растительное масло*

Традиционная экстракция. 25 г масла перенести в коническую колбу, добавить 125 мл смеси вода-ацетонитрил (16:84), 40 мл гексана и интенсивно перемешивать в течение 30 мин. В смесь внести 0.2 г хлорида натрия и после перемешивания в течение 3-5 минут перенести в делительную воронку вместимостью 250 мл. После расслоения отобрать нижний водно-ацетонитрильный слой и обезжирить его интенсивным перемешиванием сначала с 25 мл гексана (гептана, петролейного эфира), а затем с 25 мл гексана. Собрать готовый *водно-ацетонитрильный экстракт*.

Экспресс-вариант. Исключив охлаждение проб до  $-18^{\circ}\text{C}$  и размол, действовать по прописи п.п.2.

### 4. *Какао-порошок и кофе (только экспресс-вариант)*

Тонкий размол обычно не представляет труда даже при комнатной температуре. Экстракция образцов со средним содержанием как жиров (около 15%), так и белка (15-25%) всегда проблематична, т.к. для полноты извлечения требует солиubilизации и гидрофобных, и гидрофильных компонентов матрицы.

В центрифужной пробирке 5.0 г пробы смочить 12 мл *экстрагента*, встряхнуть, добавить 5 мл *растворителя*, 4 мл воды и снова встряхнуть. Внести 5 г  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и встряхивать вручную в течение 1 мин. Центрифугировать 5 мин при  $3000 \text{ мин}^{-1}$ , а затем отобрать шприцем 8 мл среднего слоя (*ацетонитрильный экстракт*) для ТФЭ-очистки.

## III.2. *Очистка и концентрирование пробы*

При подготовке проб любого из указанных выше продуктов для количественного анализа афлатоксина В<sub>1</sub> – зеараленона (*проба АЗ*) и дезоксиниваленола – Т-2 токсина (*проба ДТ*) методами ВЭЖХ, ТСХ или ГЖХ применяют комплексную схему твердофазной экстракции (очистки и концентрирования) с последовательным использованием трех патронов ДИАПАК: {А-3 + П-3 + Н (С –

кукуруза и продукты из нее)} или двух патронов ДИАПАК {АУ-3 + Н}, соответственно парам микотоксинов.

При экспресс-варианте ТФЭ-очистки всегда используют схему с двумя патронами ДИАПАК: {А-3 + Н (С – кукуруза и продукты из нее)} или ДИАПАК: {АУ-3 + Н (С – в случае сложных образцов)}.

### **III.2.1. Подготовка концентрирующих патронов**

#### **1. Концентрирующие патроны ДИАПАК А-3 и АУ-3**

- Приготовление и подготовка к работе патронов выполняется в соответствии с Инструкцией по применению специальных патронов ДИАПАК;
- При необходимости проводят испытания патронов в соответствии с МУК 4.1.787-99 (п.п. 1 и 2 прилож.1).

#### **2. Концентрирующий патрон ДИАПАК П-3**

- Подготовку к работе и регенерацию патронов выполняют в соответствии с Инструкцией по применению специальных патронов ДИАПАК;
- Прокачать через патрон 10 мл смеси вода-ацетонитрил (58:42);
- При необходимости провести испытания патрона в соответствии с МУК 4.1.787-99 (п. 1 прилож. 1).

#### **3. Концентрирующие патроны ДИАПАК Н и С**

- Подготовку патронов к работе и регенерацию патрона ДИАПАК Н выполняют в соответствии с Инструкцией по применению специальных патронов ДИАПАК;
- Прокачать через патроны по 5 мл бензола и заглушить с обоих концов;
- Регенерировать патрон ДИАПАК Н последовательным прокачиванием 5 мл этилового спирта, ацетона и бензола.

- Перед началом эксплуатации патроны следует испытать в соответствии с МУК 4.1.787-99 (пп. 3 и 4 прилож. 1) в том числе для установления оптимального объема элюирования афлатоксина В<sub>1</sub> и зеараленона с патрона ДИАПАК С.

### **III.2.2. Очистка и концентрирование пробы при определении афлатоксина В<sub>1</sub> и зеараленона (проба АЗ)**

#### ***1. Предварительная очистка и концентрирование пробы***

Традиционная очистка. 25 мл водно-ацетонитрильного экстракта прокачать через патрон ДИАПАК А-3 со скоростью скапывания 2-3 капли в секунду, отобрать 20 мл элюата и разбавить равным объемом бидистиллированной воды.

Тщательно перемешанный раствор пропустить через патрон Диапак П-3 со скоростью не более 1 капли в секунду, после чего промыть патрон 5 мл воды и осушить воздухом в течение 1 мин. Элюировать целевую фракцию АЗ последовательным прокачиванием 7 мл ацетонитрила, 7 мл смеси бензол-ацетонитрил (1:2) и 7 мл смеси бензол-ацетонитрил (1:1) со скоростью не более 1 капли в секунду в приемную колбу. Пропустить элюат через 10 г безводного сульфата натрия (2-3 см на ватном тампоне в конической воронке) самотеком в отгонную сердцевидную колбу. Ополоснуть приемник элюата 2 мл смеси бензол-ацетонитрил и пропустить через осушитель, затем промыть осушитель 3 мл той же смеси и присоединить их к элюату в отгонной колбе. Упарить целевую фракцию досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 40°C и немедленно перерастворить в 0.5 мл бензола.

Экспресс-вариант. 8 мл ацетонитрильного экстракта прокачать через патрон ДИАПАК А-3 со скоростью скапывания 2-3 капли в секунду в отгонную колбу на 25 мл. Набрать в шприц еще 2 мл ацетонитрила и нанести на патрон, элюируя целевую фракцию АЗ в ту же колбу. В случае жировых образцов (пп.2-4 в разделе III.1) нанесение ацетонитрильного экстракта на патрон ДИАПАК А-3 проводить через дополнительный патрон ДИАПАК С16М. Упарить

*целевую фракцию* досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 40°C и немедленно перерастворить в 0.5 мл бензола.

### **2. Окончательная очистка пробы на патроне ДИАПАК Н (вариант 1)**

Нанести 0.5 мл *целевой фракции* в бензоле на подготовленный патрон ДИАПАК Н, используя в качестве воронки полимерный корпус (имеется в комплекте) отбросив смыв, обмыть отгонную колбу и нанести на патрон два раза по 0.5 мл бензола, отбросив все смывы.

Элюировать зеараленон 6 мл смеси бензол-уксусная кислота (49:1) при скорости скапывания 1-2 капли в секунду в отгонную сердцевидную колбу и упарить досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 50°C до исчезновения запаха уксусной кислоты (*проба 3*).

Элюировать афлатоксин В<sub>1</sub> 5 мл смеси бензол-ацетонитрил (8:2) в отгонную сердцевидную колбу, упарить на ротационном испарителе до объема около 0.5 мл и высушить досуха в токе азота при температуре не выше 40°C (*проба А*).

### **3. Окончательная очистка пробы на патроне ДИАПАК С (вариант 2-применяется для кукурузы и продуктов из нее.)**

Нанести 0.5 мл *целевой фракции* (III.2.2. п.1) на подготовленный патрон ДИАПАК С, используя в качестве воронки пластиковый корпус (имеется в комплекте), обмыть отгонную колбу и нанести на патрон два раза по 0.5 мл бензола, отбросив все смывы.

Элюировать зеараленон 6 мл смеси бензол - этилацетат (9:1) в отгонную сердцевидную колбу и упарить досуха на ротационном испарителе при температуре не выше 50°C до исчезновения запаха бензола (*проба 3*).

Промыть патрон последовательно 3 мл смеси бензол-уксусная кислота (19:1) и 4 мл смеси эфир-гексан (3:1), отбросив все смывы, а затем элюировать афлатоксин В<sub>1</sub> 6 мл смеси дихлорметан-ацетон

(9:1) в отгонную сердцевидную колбу и упарить на ротационном испарителе до объема около 0.5 мл и высушить досуха в токе азота при температуре не выше 40°C (*проба А*).

**Немедленно!** После упаривания перерастворить *пробы А* и *З*:

- ВЭЖХ-анализ – в 0.25 мл и 0.5 мл (0.1 мл-“Милихром”) смесей вода-ацетонитрил (4:1) и (7:3), соответственно *А* и *З*. В пробу *З* добавить 0.2 мл гексана и перемешать; ТСХ-анализ - в 0.1 мл элюента по таб. 1;
- При определении афлатоксина В<sub>1</sub> в виде производного афлатоксина В<sub>2а</sub> методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием (ФМД) провести дериватизацию *пробы А* :

К сухому остатку добавить 0.2 мл гексана и 0.05 мл трифторуксусной кислоты и интенсивно перемешивать в течение ровно 30 сек (**Осторожно!** Реакцию проводить в плотно закрытой колбе). Выдержать раствор в течение 5 мин, затем добавить 1.950 мл смеси вода-ацетонитрил (9:1) и интенсивно перемешивать в течение ровно 30 сек. Дать слоям расслоиться в течение 10 мин.

### III.2.3. Очистка и концентрирование пробы при определении дезоксиниваленола и Т-2 токсина

#### 1. Предварительная очистка и концентрирование пробы

Традиционная очистка. 20 мл водно-ацетонитрильного экстракта, а затем 5 мл смеси вода-ацетонитрил (16:84) прокачать через патрон ДИАПАК АУ-3 со скоростью 2-3 капли в секунду в приемник и профильтровать через бумажный фильтр в сердцевидную отгонную колбу. Промыть фильтр 5 мл ацетонитрила и упарить раствор досуха на ротационном испарителе при 60-70°C под слабым вакуумом, добавляя 2-3 раза по 5 мл ацетонитрила или изопропанола, до исчезновения капель воды на стенках колбы. После охлаждения колбы до комнатной температуры растворить остаток в 0.5 мл сухого хлороформа.

Экспресс-вариант. 8 мл ацетонитрильного экстракта прокачать через патрон ДИАПАК АУ-3 со скоростью 2-3 капли в секунду в

отгонную колбу на 25 мл. Набрать в шприц еще 2 мл ацетонитрила и нанести на патрон, элюируя целевую фракцию *ДТ* в ту же колбу. Упарить раствор досуха на ротационном испарителе при 40-50°C и после охлаждения до комнатной температуры растворить остаток в 0.5 мл сухого хлороформа.

### **2. Окончательная очистка пробы на патроне ДИАПАК Н**

Нанести 0.5 мл пробы (III.2.3. п. 1) на подготовленный патрон ДИАПАК Н, используя в качестве воронки пластиковый корпус (имеется в комплекте), обмыть колбу и нанести на патрон два раза по 0.5 мл сухого хлороформа, начав сбор фракции Т-2 токсина в отгонную колбу. Завершить элюирование фракции 2 мл хлороформа в ту же колбу и упарить досуха на ротационном испарителе при температуре 40-45°C (*проба Т*).

Элюировать дезоксиниваленол 6 мл смеси ацетон-хлороформ (1:4) в отгонную сердцевидную колбу и упарить досуха на ротационном испарителе при температуре 40-45°C (*проба Д*).

Немедленно! Перерастворить *пробу Д* в 0.25 мл смеси вода-ацетонитрил (19:1) для ВЭЖХ-анализа (0,1 мл-“Миличром”), либо в 0.1 мл элюента (по табл. 1) для ТСХ-анализа (*пробы Д и Т*).

Определение Т-2 токсина в виде трифторацетильного производного проводят методом ГЖХ по МУ N 3184-84.

### **III.3. Подготовка пробы для анализа зеараленона по АОАС Official Method 985.18**

При необходимости контроля зеараленона в пробах пшеницы и изделий из нее в диапазоне содержаний 0.01-0.3 мг/кг (СанПиН 2.3.2.1078-01) рекомендуется использовать альтернативную схему пробоподготовки и флуориметрическое детектирование по п. V.1.

20 мл экстракта по п. III.1 упарить на ротационном испарителе при температуре 65-70°C и низком вакууме.

#### **IV. Особенности обнаружения и количественного определения микотоксинов с помощью ТСХ**

---

Сухой остаток растворить и количественно перенести в делительную воронку 20-ю мл хлороформа, добавить 20 мл 2 % раствора едкого натра, 4 мл насыщенного раствора хлористого натрия и тщательно встряхнуть. Отбросить нижний хлороформный слой, не допуская слива интерфазы, и добавить еще 20 мл хлороформа. После тщательного встряхивания дождаться полного расслоения фаз и снова отбросить нижний хлороформный слой.

Добавить в делительную воронку 20 мл раствора лимонной кислоты (10.6 г/100 мл воды) и два раза по 20 мл хлороформа, каждый раз после тщательного встряхивания и расслоения фаз собирая нижний хлороформный слой и пропуская его через 10 г безводного сульфата натрия в отгонную колбу. Промыть осушитель 2-3 мл хлороформа, объединив элюаты, и упарить досуха при температуре не выше 50°C (*проба 3*). Немедленно растворить сухой остаток в растворителе по п. III.2.2.

#### **IV. Особенности обнаружения и количественного определения микотоксинов с помощью ТСХ**

##### ***IV.1. Проведение ТСХ-анализа***

##### **IV.1.1. Количественный анализ микотоксинов на видеоденситометре**

Порядок проведения ТСХ-анализа и количественного определения содержания микотоксинов на видеоденситометре “Сорбфил” (ЗАО “Сорбполимер”, г.Краснодар) изложены в М-МВИ-68-00.

##### **IV.1.2. Полуколичественный анализ микотоксинов**

Высокая степень очистки пробы и применение в комплекте *Микотоксин-4* ТСХ высокоэффективных пластин “Сорбфил”

**IV. Особенности обнаружения** и количественного определения микотоксинов с помощью ТСХ

позволяют на практике ограничиться **одномерным вариантом ТСХ-анализа**, что резко повышает производительность аналитической работы, а обнаружение микотоксинов проводить по стандартной методологии, принятой в М-МВИ-68-00, с использованием набора для тонкослойной хроматографии НТХ-УФС-365(254) и устройства для сушки пластин УСП-1, (АО “Машиностроитель”, г. Краснодар).

Высокая интенсивность УФ-излучения, реализуемая облучателем УФС-365, повышает чувствительность определения микотоксинов и облегчает их идентификацию по изменению цвета флуоресценции после опрыскивания пластин раствором азотной кислоты (афлатоксины) и спиртовым раствором хлористого алюминия (зеараленон).

- Рекомендуемые системы элюентов для проявления микотоксинов приведены в таблице 1:

<b>Микотоксин</b>	<b>Растворитель пробы</b>	<b>Состав элюента (об. %)</b>
Афлатоксин В <sub>1</sub>	Бензол-ацетонитрил	Толуол-этилацетат-муравьиная к-та (50:40:10)
Зеараленон	Бензол	Бензол-метанол-уксусная к-та (94:4:2)
Дезоксиниваленон	Хлороформ	Толуол-этилацетат-муравьиная к-та (50:40:10)
Т-2 токсин	Бензол	Толуол-этилацетат-муравьиная к-та (50:40:10)

В отдельных случаях анализа сложных матриц оправдано проведение двумерной (в перпендикулярных направлениях) ТСХ, сочетая системы растворителей, рекомендованных как в М-МВИ-68-00, так и в таблице 1.



**IV. Особенности** обнаружения и количественного определения микотоксинов с помощью ТСХ

---

- Диаметр наносимых на пластины пятен не должен превышать 2 мм;
- При опрыскивании пластин не допускать избыточного их намокания;
- Исследовать пластины под облучателем УФС, подбирая угол наклона по максимально возможному контрасту пятен;
- Идентификацию микотоксинов проводить на основе сравнения оттенка свечения и величины  $R_f$  пятен стандартов и пробы;
- Полуколичественное определение проводить на основе визуального сравнения интенсивности флуоресценции пятен идентифицированных микотоксинов и стандартов.

### ***IV.2. Расчет содержания микотоксинов***

- Количественный расчет по данным ТСХ-анализа приведен в М-МВИ-68-00.
- Полуколичественный расчет содержания микотоксинов в образцах пищевых продуктов по данным ТСХ проводится по формуле:

$$A_X = \frac{M_X \cdot V_{II}}{10 \cdot V_X \cdot M_{\Sigma} \cdot R}, \quad (IV.1.)$$

- где:  $A_X$  – содержание микотоксина в пробе, мг/кг;  
 $M_X$  – масса микотоксина в пробе, определенная визуально, нг;  
 $V_{II}$  – объем **пробы (А, З, Д, Т)** по п. III.2.2. и п. III.2.3., мкл;  
 $V_X$  – объем **пробы (А, З, Д, Т)**, нанесенный на пластину, мкл;  
 $M_{\Sigma}$  – эквивалент массы пробы, взятой на анализ, г. При выполнении пробоподготовки в соответствии с МУК 4.1.787-99  $M_{\Sigma}$  составляет 4 г для всех четырех микотоксинов;  
 $R$  – степень извлечения микотоксина, % (афлатоксин В1- 75, зеараленон – 70, дезоксиниваленол и Т-2 токсин – 85).

Наличие в комплекте *Микотоксин-4* стандартных растворов микотоксинов и нанесение их на каждую оцениваемую пластину (что рекомендуется делать с помощью отдельного микрошприца) повышают воспроизводимость полуколичественной оценки, что позволяет рекомендовать визуальный ТСХ-анализ в качестве первичного быстрого и дешевого метода испытаний продуктов на содержание микотоксинов.

При обнаружении микотоксина на уровне 0.5-2.0 от величины ПДК необходим количественный ТСХ-, ВЭЖХ-(ГЖХ)-анализ образца, обеспечивающий получение точного результата при испытании сырья и пищевых продуктов на соответствие нормативам по СанПиН 2.3.2.1078-01.

## **V. Особенности ВЭЖХ-анализа**

### ***V.1. Особенности Аналитического комплекта Микотоксин-4***

В данном Аналитическом комплекте предлагаются различные режимы хроматографического анализа микотоксинов с разными способами детектирования, что позволяет потребителю использовать уже имеющееся хроматографическое оборудование, либо приобретать более простые и дешевые его варианты, несмотря на наличие ряда объективных трудностей определения следовых количеств веществ в сложных природных объектах.

Наиболее предпочтительными и оптимальными являются обращенно-фазовые градиентные режимы разделения микотоксинов, обеспечивающие максимальную чувствительность хроматографического анализа за счет его эффективности. В Аналитическом комплекте реализованы градиентные режимы анализа всех микотоксинов со спектрофотометрическим-СФД (афлатоксин В<sub>1</sub>, зеараленон, дезоксиниваленон) и флуориметрическим-ФМД (афлатоксин В<sub>2а</sub>, зеараленон)

детектированием в оптимальных условиях при следующих длинах волн (фильтрах):

**СФД** – афлатоксин В<sub>1</sub> – 360 нм, зеараленон – 316 нм, дезоксиниваленол – 218 нм;

**Спектральные ФМД** – афлатоксин В<sub>2а</sub> – возб. 360/ эмиссия 420 нм, зеараленон – возб. 276/ эмиссия 464 нм;

**Фильтровые ФМД:** “Флюорат 02-2М” (ТОО “Люмэкс”, г.С.-Петербург) – афлатоксин В<sub>2а</sub> - возб. Х4/ эмиссия Х3 (Х5), зеараленон - возб. 1/ эмиссия Х3 (Х5);

“Милихром-5-3-(7)” - афлатоксин В<sub>2а</sub> - возб. 360/ эмиссия №3, зеараленон - возб.316/ эмиссия №3;

Применение колонок **тип 2** вместо колонок **тип 1** позволяет значительно (в 5-10 раз) экономить расход элюента, однако необходимое разрешение пиков в этом случае достигается лишь при условии использования детекторов со специальной микрокюветой.

В градиентных режимах разделения на колонках **тип 3** реализован ВЭЖХ-анализ микотоксинов на отечественных микроколоночных хроматографах “Милихром” с детектированием на СФД и ФМД.

Использование изократических режимов разделения для всех микотоксинов существенно упрощает аппаратное оформление процесса хроматографии, однако делает невозможным анализ афлатоксина В<sub>1</sub>. В этих режимах для повышения чувствительности СФД заменяется на ФМД и афлатоксин В<sub>1</sub> анализируется в виде производного афлатоксина В<sub>2а</sub>. Флуориметрическое детектирование зеараленона также оказывается предпочтительным для продуктов с нормативами предельно допустимого содержания 0.1-0.2 мг/кг.

Важным преимуществом Аналитического комплекта *Микотоксин-4* является применение для ВЭЖХ-анализа только бинарных смесей вода-ацетонитрил в диапазоне 5-80 об.% ацетонитрила, что

обеспечивает возможность его регенерации и сокращения стоимости единичного анализа.

## ***V.2. Порядок проведения ВЭЖХ-анализа***

### **V.2.1. Приготовление элюентов**

Приготовить смеси ацетонитрил-вода в объемных соотношениях (5:95) - *элюент 5*, (1:9) - *элюент 10*, (2:8) - *элюент 20*, (1:3) - *элюент 25*, (1:1) - *элюент 50*, (7:3) - *элюент 70* и (8:2) - *элюент 80*, отмеряя растворители разными цилиндрами, профильтровать через мембранный фильтр с порами 0.45 мкм и провести вакуумную или термическую дегазацию.

### **V.2.2. Условия хроматографического анализа**

1. На любых хроматографах зарубежных фирм (колонка **ТИП 1**)
  - линейный градиент за 20 мин от 10 до 90% *элюентов*:  
*70* в *10* при скорости потока 1.0 мл/мин (афлатоксин В<sub>1</sub> и зеараленон), объем пробы - не более 0.05 мл, время удерживания: афлатоксин В<sub>1</sub> ~10 мин, зеараленон ~16 мин;
  - линейный градиент за 20 мин от 10 до 90% *элюентов*:  
*20* в *5* при скорости потока 0.8 мл/мин (дезоксиниваленол), объем пробы - не более 0.05 мл, время удерживания ~8 мин;
  - линейный градиент за 20 мин от 10 до 60% *элюентов*:  
*70* в *10* при скорости потока 0.8 мл/мин (афлатоксин В<sub>2а</sub>), объем пробы - не более 0.05 мл, время удерживания ~10 мин;
2. На любых хроматографах зарубежных фирм с детектором, снабженным микрокуветой (колонка **ТИП 2**)
  - линейный градиент за 20 мин от 10 до 90% *элюентов*:  
*80* в *10* (афлатоксины В<sub>1</sub> и В<sub>2а</sub> и зеараленон) и *20* в *бидистиллированной воде* (дезоксиниваленол), скорость потока 0.2 мл/мин, объем пробы - не более 0.05 мл, время

- удерживания: афлатоксины  $V_1$  ~12 мин и  $V_{2a}$  ~8 мин, зеараленон ~19 мин, дезоксиниваленол ~15 мин;
- изократическое разделение при скорости потока 0.2 мл/мин и объеме пробы не более 0.02 мл: афлатоксин  $V_{2a}$  - **элюент 25**, время удерживания ~8 мин, зеараленон - **элюент 50**, время удерживания ~12.5 мин, дезоксиниваленол - **элюент 10**, время удерживания ~13.5 мин;
  - 3. На хроматографе “Милихром А-02” (колонка **ТИП 3**) - линейный градиент за 15 мин от 10 до 90% **элюентов: 70 в 10** (афлатоксин  $V_1$  и зеараленон) и **20 в 5** (дезоксиниваленол), скорость потока 0.1 мл/мин, объем пробы - не более 0.02 мл, время удерживания афлатоксина  $V_1$  ~15 мин, зеараленона ~19 мин и дезоксиниваленола ~12 мин;
  - 4. На хроматографе “Милихром-5-3-(7)” (колонка **ТИП 3**) - преформированный ступенчатый градиент в сосудах для элюентов №№ 8-1 УВПА (состав и объемы ступеней, мкл, соответственно):
    - при анализе афлатоксина  $V_1$  и зеараленона – **элюент 20** - 700 мкл; смеси **20:70** — 9:1 - 300, 4:1 - 300, 7:3 - 200, 3:2 - 200, 2:3 - 200, 1:4 - 300, и **элюент 70** - 300;
    - при анализе дезоксиниваленола – **элюент 5** - 1000 мкл; **элюент 10** - 600, **элюент 20** - 600, и **элюент 70** - 300;
    - объем регенерации в обоих случаях - 400 мкл (**элюент 20** или **5**, соответственно), скорость потока – 100 мкл/ мин, объем пробы – 20 мкл;
    - время удерживания: афлатоксины  $V_1$  ~15 мин и  $V_{2a}$  ~9 мин, зеараленон ~19 мин и дезоксиниваленол ~12 мин.

### V.2.3. Подготовка хроматографа

- Установить на хроматограф колонку ДиАСФЕР-110-С16 соответствующего типоразмера и стабилизировать систему

при начальных параметрах градиента (изократического разделения), контролируя уровни шума и дрейфа базовой линии в условиях детектирования ;

- Хроматограф считается подготовленным, а колонка стабилизированной, если уровни шума и дрейфа базовой линии соответствуют таковым на специальных тестовых хроматограммах, поставляемых с аналитической колонкой.

#### **V.2.4. Градуировка хроматографа**

- Градуировку хроматографа осуществляют последовательным вводом в условиях п. V.2.2. номинального объема ряда рабочих растворов микотоксинов со следующими диапазонами концентраций (с произвольным шагом в зависимости от ожидаемой концентрации в пробе): 0.05-0.5 мкг/мл – афлатоксин В<sub>1</sub>, 0.2-3.0 (2.0-30) мкг/мл – зеараленон и 2.0-20 мкг/мл-дезоксиниваленол. Для этого Стандартные растворы для ВЭЖХ микотоксинов (имеются в комплекте), развести смесью ацетонитрил-вода или бидистиллированной водой в нужное число раз, учитывая точную концентрацию микотоксина, указанную в паспорте стандарта. Конечная концентрация ацетонитрила в растворе должна приближаться к его концентрации в смеси ацетонитрил-вода, предназначенной для растворения подготовленной пробы продукта по п. III.2.2 и III.2.3.
- При анализе афлатоксина В<sub>1</sub> в виде производного В<sub>2a</sub> точно отмеренные аликвоты Стандартного раствора, содержащие 0.002-0.02 мкг В<sub>1</sub>, упарить в слабом токе азота досуха и далее провести дериватизацию по III.2.2. п. 3.
- При необходимости перевода в водный ацетонитрил Стандартных растворов для ТСХ точно отмеренную аликвоту раствора перенести в отгонную колбу минимального объема и упарить досуха на ротационном испарителе (дезоксиниваленол и зеараленон) или в слабом токе азота (афлатоксин В<sub>1</sub>) при температуре не выше 40°C. Немедленно перерастворить

стандарт в равном аликвоте объеме **элюентов: 20** (афлатоксин В<sub>1</sub> и зеараленон) и **5** (дезоксиниваленон). Растворы меньших концентраций получают методом последовательных разведений указанными элюентами.

- После математической обработки полученных хроматограмм зафиксировать времена удерживания и площади пиков микотоксинов и, при необходимости, построить градуировочные графики.

### V.2.5. Проведение ВЭЖХ-анализа

- Номинальный объем подготовленных **проб А, З** или **Д** ввести не менее двух раз в хроматограф в режимах по п. V.2.2.
- После математической обработки хроматограмм провести идентификацию искомых микотоксинов по параметрам удерживания и рассчитать среднюю площадь пиков.
- По соответствующим градуировочным графикам определить концентрации идентифицированных микотоксинов в подготовленных пробах.

### V.3. Расчет содержания микотоксинов

Количественный расчет содержания нормируемых микотоксинов в образцах зерна и зернопродуктов, орехов, семян масличных культур и растительного масла проводится с учетом эквивалента массы взятой на анализ пробы по формуле:

$$C_{\text{ПР}} = \frac{C_X \cdot V_X}{M_3 \cdot R} \cdot 100, \quad (\text{V.1.})$$

где:  $C_{\text{ПР}}$  – определяемое содержание микотоксина в пробе, мг/кг;  
 $C_X$  – концентрация микотоксина в **пробе (А, З, Д)**, определенная по градуировочной зависимости, мкг/мл;

$V_x$  – объем *пробы* (А, З, Д) по III.2.2. и III.2.3., мл;

$M_э$  – эквивалент массы пробы (п. IV.2.), взятой на анализ, г;

R – степень извлечения микотоксина, % (афлатоксин В<sub>1</sub> – 75, зеараленон – 70, дезоксиниваленол – 85).

Разработал: \_\_\_\_\_ /Васяров Г.Г./

\_\_\_\_\_ /Алексеева Г.С./

“\_\_” \_\_\_\_\_ 2008 г





*Для заметок*

---





Закрытое Акционерное Общество “**БиоХимМак СТ**”

Россия, 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1 стр.11

тел./факс (495) 939-59-67, 939-58-06 /офис/,

(499) 135-88-14 /лаборатория/

[www.bcmst.ru](http://www.bcmst.ru) E-mail:info@bcmst.ru