

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Аналитического комплекта

Патулин

№ 5-01-97

от 14.11.2001

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

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 *Патулин*

I.1. Цель выпуска комплекта

Целью выпуска Аналитического комплекта *Патулин* является обеспечение воспроизводимых условий пробоподготовки и хроматографического анализа образцов продуктов переработки фруктов и овощей, включая консервы и концентраты, испытание которых на возможное содержание микотоксина патулина предусмотрено основным документом "Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов", СанПиН 2.3.2.560-96, М., Изд. Госкомсанэпиднадзора России, 1997.

I.2. Назначение комплекта

Аналитический комплект *Патулин* предназначен для концентрирования и очистки соков и напитков, а также водных экстрактов консистентных продуктов от компонентов, мешающих определению патулина, методами высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) и тонкослойной (ТСХ) хроматографии. Методы подготовки проб и ТСХ-анализа патулина изложены в следующих нормативных документах, соответственно:

- “Определение массовой концентрации микотоксинов в продовольственном сырье и продуктах питания. Подготовка проб методом твердофазной экстракции”, МУК 4.1.787-99, Минздрав России, М., 1999.

- “Методические рекомендации по обнаружению, идентификации и определению содержания патулина в фруктовых и овощных соках и пюре”, утв. МЗ СССР ¹ 2655-82.
- “Продукты переработки плодов и овощей. Метод определения микотоксина патулина”, ГОСТ 28038-89.

Метод ТСХ-анализа патулина, предлагаемый ЗАО “БиоХимМак СТ” и воплощенный в Комплекте *Патулин-ТСХ*, базируется на принятой в международной нормативной практике методологии (ст. 974.18 AOAC Off. Meth. of Analysis). Метод ВЭЖХ - анализа патулина впервые разработан ЗАО “БиоХимМак СТ” на основе ст. 995.10 AOAC Off. Meth. of Analysis и реализован в Комплекте *Патулин* как на традиционных зарубежных, так и на отечественных хроматографах "Милихром-5-3 или -5-7", "Милихром А-02" и "Стайер".

1.3. Особенности комплекта Патулин

Характерными особенностями комплекта *Патулин* являются:

- ⇒ Полная замена при подготовке проб традиционной жидкостной экстракции, требующей больших объемов токсичных и дорогостоящих органических растворителей, на твердофазную экстракцию с применением концентрирующих патронов "ДИАПАК" (ЗАО “БиоХимМак СТ”);
- ⇒ Высокий выход патулина (~60%);
- ⇒ 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 "Доркус" для одновременной подготовки до 12 проб (поставляется ЗАО "БиоХимМак СТ").

Уникальной особенностью комплекта *Патулин* является возможность определения патулина в соках или водных вытяжках плодов, овощей, продуктов их переработки и кормов, минуя такие маловоспроизводимые стадии, как многократная переэкстракция в этилацетат, что обеспечивает исключительные преимущества для *сертификационных работ* центров ГСЭН России, станций защиты растений, ветеринарных и агрохимических служб.

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

II. Состав комплекта¹ *Патулин*

1. Комплект концентрирующих патронов, обеспечивающий подготовку 100 единичных проб методом твердофазной экстракции для определения патулина, включает патроны "ДИАПАК" двух разновидностей, выпускаемые по ТУ 4215-002-05451931-94:

¹ Общелабораторное оборудование и растворители в состав набора не входят, их варианты приведены в МР №2655-82 и ГОСТ 28038-89.

Состав комплекта Патулин

- Диапак П-3 (2 шт.) - универсальный концентрирующий патрон многоразового применения (до 50 проб) с набором верхних и нижних фильтров (10 шт.);
 - Диапак С (100 шт.) - универсальный патрон для тонкой очистки одноразового применения.
2. Корпус пластиковой колонки с фильтром для осушительной колонки - 2 шт.
3. Стандартный раствор патулина объемом 1 мл в ампуле (1 шт.) с аттестованной концентрацией (точное значение концентрации патулина указывается в прилагаемом паспорте), свидетельство о метрологической аттестации и общая инструкция по применению стандартного образца прилагаются:
- 100 мкг/мл в ацетонитриле (ВЭЖХ);
 - 10÷20 мкг/мл в смеси бензол-ацетонитрил (ТСХ).
4. Средство разделения (по ТУ 4215-001-05451931-94):
- хроматографическая колонка ДИАСФЕР-110-(ДИАСОРЬ-130-) С10СН, 4x150 мм, для хроматографа “Стайер” или любого импортного, 1шт. (колонка **ТИП 1**);
 - хроматографическая колонка ДИАСФЕР-110-(ДИАСОРЬ-130-) С10СН, 2x80 мм и 2x75 мм для хроматографов “Милихром-5-3 или -5-7” и “Милихром А-02”, соответственно, 1 шт. (колонка **ТИП 2**);
 - тонкослойные пластины “Сорбфил” типа ПТСХ-АФ-В, 10x15 см -50 шт. (Комплект *Патулин-ТСХ*).

5. Обнаруживающий реагент (МВТН), 1 г - 2 уп. (Комплект *Патулин-ТСХ*).
6. Инструкция по применению комплекта *Патулин* и *Патулин-ТСХ*.

III. Порядок проведения пробоподготовки

III.1. Отбор пробы и экстракция патулина

⇒ При анализе соков и напитков с мякотью, а также консистентных продуктов, в соответствии с ГОСТ 28038-89 навеску пробы массой 10,0 г поместить в стеклянный стакан, смешать с небольшим количеством дистиллированной воды и количественно перенести в мерную колбу вместимостью 50 мл. В колбу внести по 6,0 мл раствора Карреза I и раствора Карреза II. Содержание колбы довести дистиллированной водой до метки, тщательно перемешать и отфильтровать в мерный цилиндр через бумажный складчатый фильтр. Измерить объем прозрачного фильтрата (*фильтрат II*).

⇒ При подготовке осветленных соков и напитков отфильтровать пробу через плотный бумажный фильтр до получения 20 мл прозрачного фильтрата (*фильтрат II*).

III.2. Очистка экстракта

При подготовке проб любых продуктов переработки фруктов и овощей, а также консервов и концентратов для количественного анализа патулина методами ВЭЖХ и ТСХ применяется комплексная схема твердофазной экстракции (очистки и концентрирования) с последовательным использованием двух патронов ДИАПАК: {П-3 + С}.

Ш.2.1. Подготовка концентрирующих патронов

1. Концентрирующий патрон ДИАПАК П-3

- ⇒ Подготовка к работе и регенерация патрона выполняется в соответствии с Инструкцией по применению специальных патронов ДИАПАК;
- ⇒ Прокачать через патрон 10 мл смеси вода-ацетонитрил (58:42);
- ⇒ Непосредственно перед проведением пробоподготовки прокачать через патрон 10 мл дистиллированной воды;
- ⇒ При необходимости патрон следует испытать в соответствии с МУК 4.1.787-99 (п. 5 прилож. 1).

2. Концентрирующий патрон ДИАПАК С

- ⇒ Подготовка к работе патрона выполняется в соответствии с Инструкцией по применению специальных патронов ДИАПАК;
- ⇒ Прокачать через патрон 5 мл бензола и заглушить с обоих концов;
- ⇒ Перед началом эксплуатации патрон следует испытать в соответствии с МУК 4.1.787-99 (п. 4.3. Прилож.1) для установления оптимального объема элюирования патулина.

Ш.2.2. Концентрирование пробы на патроне ДИАПАК П-3

- ⇒ Весь объем **фильтрата П** нанести на предварительно кондиционированный патрон со скоростью 1-2 капли в секунду;
- ⇒ Промыть патрон 5 мл бидистиллированной воды, отбрасывая все смывы;
- ⇒ Элюировать патулин с патрона 10 мл этилацетата в колбу или мерную пробирку с пришлифованной пробкой, содержащую 5 мл 1,5% водного раствора *карбоната натрия*, закрыть пробкой, интенсивно перемешать и дать расслоиться;
- ⇒ Собрать осушительную колонку, заполнив корпус с фильтром примерно 2 г безводного сульфата натрия, уплотнить осушитель постукиванием по стенке колонки и зафиксировать ватным тампоном;
- ⇒ Декантировать верхний этилацетатный слой при помощи пипетки, профильтровать через осушительную колонку, собирая фильтрат в отгонную сердцевидную колбу на 50 мл;
- ⇒ Дополнительно проэкстрагировать водный раствор *карбоната натрия* сначала 10 мл, а затем 5 мл этилацетата и, после расслоения, последовательно профильтровать декантированные объемы этилацетата через осушительную колонку в ту же колбу;
- ⇒ Упарить этилацетат на ротационном испарителе при температуре не выше 40°C до объема около 0.5 мл (**не упаривать досуха!**), перенести количественно в сердцевидную колбу вместимостью не более 5 мл, обмыть предыдущий приемник 0,5 мл этилацетата и присоединить объем к пробе;

Особенности проведения ВЭЖХ-анализа

⇒ Упарить пробу в токе азота в суховоздушной бане (алюминиевом термостатируемом блоке, поставляется ЗАО “БиоХимМак СТ”) при температуре не более 40°C до 0,5 мл и добавить 2,5 мл бензола (*соблюдать соотношение объемов 1:5!*).

Ш.2.3. Очистка пробы на патроне ДИАПАК С

⇒ Снять заглушки с подготовленного патрона и пропустить бензол-этилацетатный раствор со скоростью 1-2 капля в секунду. Обмыть колбу ещё 0,5-1,0 мл смеси *бензол-этилацетат* (85:15) и нанести на патрон, отбросив смывы;

⇒ Элюировать патулин с патрона 6 мл смеси *бензол-этилацетат* (7:3), собирая элюат в сердцевидную отгонную колбу;

⇒ Упарить элюат досуха в токе азота на суховоздушной бане при температуре не более 40°C;

⇒ **Немедленно!** После упаривания перерастворить пробу в 0,1 мл хлороформа, охлажденного до 0-5°C (ТСХ-анализ), или в 0,2-0,5 мл ($C=2-5$ мкг/мл при наличии 1 ПДК патулина в пробе) охлажденной до 5-8°C бидистиллированной воды, подкисленной уксусной кислотой до pH 4,0, (ВЭЖХ-анализ) и быстро охладить до 0-5°C (*проба II*). Хранить *пробу II* в холодильнике не более 1 часа.

IV. Особенности проведения ВЭЖХ-анализа

Малая чувствительность ТСХ-метода и выгодные спектральные характеристики детектирования (длина волны максимального поглощения около 275 нм при величине молярной экстинкции около

15000) делают именно ВЭЖХ предпочтительным методом количественного анализа патулина в плодоовощной продукции.

ВЭЖХ-анализ патулина в отечественной нормативной литературе описан в нормально-фазовом изократическом варианте (ГОСТ 28038-89, дополн.1). В зарубежной литературе описаны обращенно-фазовые варианты ВЭЖХ-анализа патулина и сопутствующих примесей на традиционных C₁₈-сорбентах (элюент-вода).

В аналитическом комплекте *Патулин* предлагается ВЭЖХ-анализ на специально разработанных сорбентах ЗАО "БиоХимМак СТ" в подвижной фазе ацетонитрил-вода, что позволяет детектировать патулин на длине волны 276 нм, а в случае хроматографов "Милихром" - использовать многоволновое детектирование для точной идентификации патулина. Для любых типов хроматографов реализуется вариант градиентного элюирования, дающий дополнительный выигрыш в чувствительности определения.

IV.1. Порядок проведения ВЭЖХ-анализа

IV.1.1. Приготовление элюентов

⇒ Приготовить две смеси бидистиллированной воды и ацетонитрила в объемных долях (95:5) - *элюент А*, (80:20) - *элюент Б*. Профильтровать элюенты через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и провести их вакуумную или термическую дегазацию.

IV.1.2. Условия хроматографического анализа

⇒ На хроматографах зарубежных фирм или “Стайер” (колонка **ТИП 1**) – линейный градиент от 10 до 90% *элюента Б* в бидистиллированной воде за 20 мин при скорости потока 0,8 мл/мин, объем пробы 0.02-0.05 мл, время удерживания 6-7 мин.

⇒ На хроматографе “Милихром А-02” (колонка **тип 2**)-, линейный градиент от 10 до 90 % *элюента Б* в бидистиллированной воде при скорости потока 0,8-1,0 мл/мин, объем пробы не более 20 мкл, время удерживания около 8 мин;

⇒ На хроматографе "Милихром-5" (колонка **ТИП 2**) – четырехступенчатый градиент: 500 мкл бидистиллированной воды (300 мкл- на регенерацию), по 300 мкл *элюента А*, *смеси А:Б* (2:1 по объему) и *элюента Б*; скорость потока 100 мкл/мин, объем пробы не более 20 мкл, время удерживания патулина около 8 мин.

IV.1.3. Подготовка хроматографа

⇒ Установить на хроматограф колонку соответствующего типоразмера и стабилизировать ее в условиях холостого градиента или изократического элюирования, контролируя уровни шума и дрейфа базовой линии на длине волны детектирования 274-276 нм.

Хроматограф считается подготовленным, а колонка стабилизированной, если уровни шума и дрейфа базовой линии соответствуют таковым на специальной тестовой хроматограмме патулина, поставляемой с аналитической колонкой.

IV.1.4. Градуировка хроматографа

⇒ Градуировку хроматографа осуществляют последовательным вводом в условиях IV.1.2. номинального объема ряда рабочих растворов, приготовленных из стандартного образца патулина, с концентрациями (с произвольным шагом в зависимости от ожидаемой концентрации в пробе) в диапазоне 0,5- 10 мкг/мл. Для этого стандартный раствор патулина для ВЭЖХ, имеющийся в комплекте, разводят бидистиллированной водой в нужное число раз, учитывая точную концентрацию патулина, указанную в паспорте стандарта.

⇒ После математической обработки полученных хроматограмм фиксируют времена удерживания и площади пиков патулина и, при необходимости, строят градуировочные графики.

IV.1.5. Проведение ВЭЖХ-анализа

⇒ Номинальный объем подготовленной по п. III.2. **пробы II** ввести не менее двух раз в хроматограф в режиме по п. IV.1.2.

⇒ После математической обработки хроматограмм провести идентификацию пиков патулина по параметрам удерживания и рассчитать среднюю площадь пиков.

⇒ По соответствующим градуировочным графикам методом абсолютной градуировки определить концентрации идентифицированного патулина в подготовленных пробах.

IV.1.6. Расчет содержания патулина

Количественный расчет содержания патулина в исходном образце по данным ВЭЖХ проводится по методу абсолютной градуировки с учетом эквивалента массы пробы по формуле:

$$C_{\text{пр}} = \frac{C_{\text{х}} \cdot V_{\text{х}}}{M_{\text{э}}} \cdot 1000, \text{ где} \quad (\text{IV.1.})$$

$C_{\text{пр}}$ – определяемое содержание патулина в пробе, мг/кг;

$C_{\text{х}}$ – концентрация патулина в *пробе*, определенная по градуировочной зависимости, мг/мл;

$V_{\text{х}}$ – объем *пробы* по III.2.3., мл;

$M_{\text{э}}$ – эквивалент массы пробы, взятой на анализ, г.

Эквивалент массы пробы осветленных соков и напитков составляет 20 г. Эквивалент массы пробы соков и напитков с мякотью, а также консистентных продуктов определяется по формуле:

$$M_{\text{э}} = \frac{V_{\text{ф}}}{50} m_{\text{пр}}; \text{ где} \quad (\text{IV.2.})$$

$M_{\text{э}}$ – эквивалент массы пробы, взятой на анализ, г;

$V_{\text{ф}}$ – объем *фильтрата II*, мл;

$m_{\text{пр}}$ – масса навески пробы;

V. Особенности проведения ТСХ-анализа

V.1. Порядок проведения ТСХ-анализа

Порядок проведения ТСХ-анализа и полуколичественной оценки содержания патулина путем визуального сравнения интенсивности флуоресценции комплекса хлорированного патулина с бензидином приведен в МР №2655-82 и ГОСТ 28038-89. Недостатком описанного способа является громоздкость двумерной ТСХ и необходимость работы с канцерогенным бензидином.

Применение в Комплекте *Патулин-ТСХ* высокоэффективных пластин “Сорбфил”, обнаруживающего реагента МВТН, а также стандартного раствора патулина позволяют ограничиться **одномерным вариантом ТСХ-анализа**, а обнаружение патулина проводить по стандартной схеме, принятой в международной нормативной практике (ст. 974.18 AOAC Off. Meth. of Analysis), что резко повышает производительность и безопасность аналитической работы.

V.2. Рекомендуемая схема проведения ТСХ-анализа

ТСХ-анализ проводится на пластинках “Сорбфил” типа ПТСХ-АФ-В, 10x15 см, с использованием набора НТХ-УФС-365 и устройства для сушки пластин УСП-1, выпускаемых АО “Машиностроитель”, г. Краснодар.

V.2.1. Приготовление раствора обнаруживающего реагента

50 мг 3-метил-2-бензтиазолинон гидразона (МВТН) растворить в 10 мл дистиллированной воды. Раствор 0,5% МВТН хранить в холодильнике не более 3 дней.

V.2.2. Проведение ТСХ-анализа

⇒ Нанести на стартовую линию два раза по 5,0 мкл и один раз 10,0 мкл **пробы II** (п. III.2.3.); а также 1,0, 2,5 и 5,0 мкл стандартного рабочего раствора патулина с концентрацией 20 мкг/мл (20, 50 и 100 нг патулина в пятне, соответственно) с помощью двух микрошприцов для ТСХ на 10 мкл. Нанести 2,5 мкл стандартного рабочего раствора патулина в одно из пятен пробы из 5 мкл. **Диаметр наносимых пятен не должен превышать 2 мм!**

⇒ Пластину поместить в насыщенную (не менее 30 мин) камеру 15x15 см со смесью толуол-этилацетат-муравьиная кислота (5:4:1).

⇒ После пробега фронта элюента не менее 12 см пластину извлечь из камеры и высушить под вытяжным шкафом до полного исчезновения запаха растворителя. Процесс заметно ускоряется при нагревании пластины (*не выше 40°C!*) на устройстве УСП-1.

⇒ Снова поместить пластину в камеру и провести повторное проявление на ту же величину пробега фронта элюента, а затем повторно высушить.

V.2.3. Обнаружение и полуколичественное определение патулина

⇒ Равномерно опрыскать пластину 0,5% МВТН из стеклянного распылителя (*не допуская избыточного намокания!*), и нагревать на устройстве УСП-1 в течение 15 мин при температуре 120°C.

⇒ Исследовать пластину под облучателем УФС-365, подбирая угол наклона по максимально возможному контрасту пятен. Патулин проявляется как пятно с желто-коричневой

флуоресценцией при R_f $0.6 \div 0.7$. Критерием чувствительности метода считается обнаруживаемость пятна с содержанием патулина 20 нг (первое пятно в серии). Патулин также обнаруживается как желтое пятно в видимом свете, начиная с 50 нг и выше.

⇒ Сравнить хроматограмму пробы и стандартов. Флуоресцирующее пятно патулина в пробе должно иметь окраску и величину R_f , идентичные пятнам патулина в стандартах. Интенсивность пятна проба+внутренний стандарт должна быть выше, чем пятен только пробы или только соответствующего стандарта. Соблюдение этих условий является критерием правильной идентификации патулина в пробе.

⇒ Полуколичественное определение патулина состоит в визуальном сравнении интенсивности флуоресценции пятен идентифицированного патулина в пробе и стандартах. Для облегчения количественного сравнения рекомендуется слегка удалить пластину от облучателя так, чтобы выбранные пары пятен сравнивались по величине оптической плотности.

V.2.4. Расчет содержания патулина

Полуколичественный расчет содержания патулина в образцах фруктов и овощей, а также продуктах их переработки проводится с учетом эквивалента массы пробы по формуле:

$$A_x = \frac{M_x \cdot V_{II}}{V_x \cdot M_{\text{э}} \cdot 1000}; \text{ где} \quad (V.1.)$$

A_x – содержание патулина в пробе, мг/кг;

M_x - определенная масса микотоксина в пробе, нг;

V_{II} – объем **пробы II** по п. III.2.3., мл;

Особенности проведения ТСХ-анализа

V_x – объем *пробы П*, нанесенный на пластину, мкл;

$M_э$ – эквивалент массы пробы, взятой на анализ, г (по формуле IV.2.). $M_э$ осветленных соков и напитков составляет 20 г.

Нанесение стандартного раствора патулина на каждую пластину повышают точность и воспроизводимость полуколичественной оценки содержания патулина в образцах.

При полуколичественном обнаружении патулина на уровне $0.5 \div 2.0$ от величины ПДК ($0.025 \div 0.1$ мг/кг) необходим ВЭЖХ- анализ образца, обеспечивающий получение точного количественного результата при испытаниях продовольственного сырья и пищевых продуктов на соответствие нормативам по СанПиН 2.3.2.560-96.

Разработал: _____ /Васяров Г.Г./

_____ /Алексеева Г.С. /

“ ___ “ _____ 2000 г

Для заметок

Для заметок

Закрытое Акционерное Общество "БиоХимМак СТ"

Россия, 119899, Москва, Ленинские горы
тел./факс (095) 939-59-67 939-58-06/офис/
939-36-66 /лаборатория/
e-mail bcmst@bcm.chem.msu.ru